

**Untersuchungen
zum Reaktionsmechanismus der durch
Aminopeptidase M
katalysierten Peptid-Spaltung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum**

vorgelegt von
Uwe Femfert

Bochum

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Untersuchungen
zum Reaktionsmechanismus der durch
Aminopeptidase M
katalysierten Peptid-Spaltung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum**

**vorgelegt von
Uwe Femfert**

**Bochum
1969**



1. Berichterstatter: Prof. Pfleiderer
2. Berichterstatter: Prof. Faillard
Dekan: Prof. Pfleiderer
Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.1969

Inhalts - Übersicht

1. Einleitung und Problemstellung.....	1
2. Ergebnisse und Diskussion.....	4-67
2.1. Die Substratspezifität der Amino-peptidase M....	4
2.2. Der Einfluß von Metall-Ionen auf das kataly- tische Verhalten der Amino-peptidase M.....	10
2.2.1 Der Einfluß von Kobalt-II-Ionen auf die Aktivität der Amino-peptidase M.....	11
2.2.2 Der Einfluß anderer Metall-Ionen auf die Aktivität der Amino-peptidase M.....	16
2.2.3 Der Einfluß von Komplexbildnern auf die Aktivität der Amino-peptidase M.....	17
2.2.3.1 Der Einfluß von Äthylendiamin-tetraacetat auf die Aktivität der Amino-peptidase M.....	17
2.2.3.2 Der Einfluß von o-Phenanthrolin auf die Aktivität der Amino-peptidase M.....	18
2.2.3.3 Der Einfluß von 2,2'-Dipyridyl auf die Aktivität der Amino-peptidase M.....	21
2.3 Der Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration auf die Geschwindigkeit der durch Amino-peptidase M katalysierten Hydrolyse von L-Alanin-4-Nitranilid.	22
2.4 Die Reaktion von Amino-peptidase M mit 5-Diazonium-1-H-Tetrazol.....	33
2.5 Die Reaktion von Amino-peptidase M mit Tetranitromethan.....	43
2.6 Die Einwirkung von Phosphorsäure-Estern auf die Amino-peptidase M.....	51

2.7	Die Einwirkung von Halogenketonen auf die Aminopeptidase M	51
2.8	Die Temperaturabhängigkeit der Amino- peptidase Reaktion	53
2.9	Die Topographie des aktiven Zentrums und der Reaktionsmechanismus der Aminopeptidase M	58
2.10	Zusammenfassung	66
3.	Geräte	68
4.	Methoden	69
5.	Material	80
6.	Reagenzien	87
7.	Literatur-Verzeichnis	90

1. Einleitung und Problemstellung

Die Makromoleküle der Enzyme katalysieren in vielen Fällen Reaktionen zwischen sehr viel kleineren Substrat-Molekülen. Aus dieser Relation der Größenverhältnisse zwischen Katalysator-Molekül einerseits und umgesetzten Substraten andererseits folgt dann unmittelbar, daß nur ein relativ kleiner Bezirk des Enzym-Proteins, das "aktive Zentrum", sich im Verlauf der Reaktion in direktem Kontakt mit den Substraten befindet, die dort fixiert, dann aktiviert und schließlich transformiert werden.

Nach unseren heutigen Vorstellungen sind die aktiven Zentren der Enzyme Mikrobereiche des Protein-Moleküls in denen die Aminosäure-Sequenz und eine spezifische Konformation der Aminosäure-Seitenketten eine mehr oder weniger flexible Struktur ausbilden, die zunächst die Bindung aller Reaktionsteilnehmer ermöglicht und dann die charakteristischen Elektronenverschiebungen der betrachteten Reaktion ermöglicht.

Die spezifische Konformation der Aminosäure-Seitenketten im Protein-Makromolekül ist so stark von äußeren Einflüssen abhängig, daß jede lokalisierende Abgrenzung eines aktiven Zentrums stets willkürlich sein muß.

Betrachtet man das schematisierte Bild eines aktiven Zentrums (Bild 1), dann gehören neben den in die reaktionsgenuinen Elektronen-Umordnungen selbst eingreifenden "reaktiven" Aminosäuren (R) auch alle diejenigen Seitenketten, die sich im direkten Kontakt mit dem Substrat befinden, die "Kontakt"-Aminosäuren (K), wohl mit Sicherheit zum aktiven Zentrum.

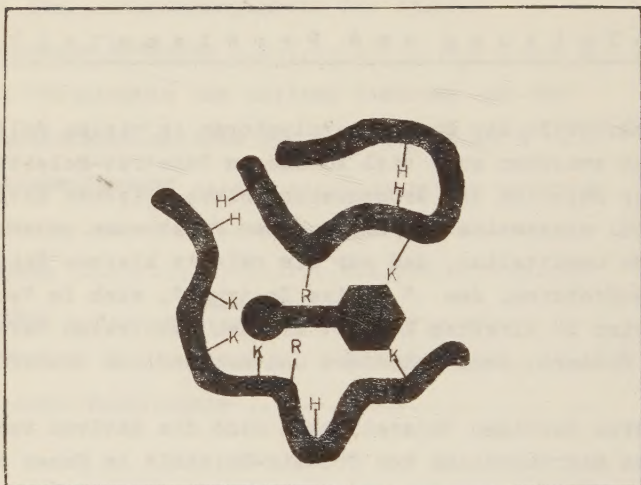


Bild 1: Schema eines aktiven Zentrums
Der Kugel und Sechseck verbindende Strang symbolisiert die zu spaltende Bindung.

R= reaktive Aminosäure-Seitenketten, die direkt in die Elektronen-Umordnungen eingreifen

K= Kontakt-Aminosäuren, an der Substrat-Fixierung beteiligt

H= Hilfs-Aminosäuren, stabilisieren die spezifische Konformation des aktiven Zentrums

Aber auch die als Hilfsfaktoren mit H bezeichneten Seitenketten müssen unter Umständen als Teil des aktiven Zentrums gewertet werden, wenn sie durch Wechselwirkungen kovalenter, heteropolarer oder hydrophober Art die sterische Situation des aktiven Zentrums festlegen.

Die Aufklärung der Reaktionsmechanismen von enzymatisch katalysierten Vorgängen gehört seit der Entdeckung der enzymatischen Katalyse zu den Hauptaufgaben des Biochemikers.

Impliziert man, daß alle von Enzymen gesteuerten Vorgänge ein nichtenzymatisches Analogon besitzen, dessen Gesetzmäßigkeit auch der enzymatische Prozeß unterworfen ist, dann muß jede ernsthaft zu diskutierende Theorie der Enzymkatalyse auf den Prinzipien der Elektronentheorie chemischer Reaktionen fußen. Diese Rückführung der im Organismus ablaufenden Bio-Katalyse auf niedermolekulare, überschaubare Modell-Reaktionen geht auf W. OSTWALD zurück:

" Ich möchte meine Überzeugung dahin aussprechen, daß bei eingehender Forschung Übergänge zwischen den eiweißartigen Produkten, an denen bisher Enzymwirkungen nachgewiesen worden sind, und den einfacher zusammengesetzten Stoffen der organischen Chemie sich werden finden lassen". (1).

Derartige Modellvorstellungen müssen dann aber auch die bei der enzymatischen Katalyse tatsächlich ablaufenden Vorgänge in möglichst guter Annäherung wiedergeben.

So kann man etwa die durch Chymotrypsin katalysierte Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat mit der imidazolkatalysierten Reaktion zwar in Hinsicht auf die identischen Anfangs- und Endprodukte vergleichen, nicht aber in Bezug auf Zwischenprodukte und Reaktionsmechanismen:

Imidazol katalysiert die Hydrolyse von Nitrophenylacetat unter intermediärer Bildung von labilem Acetyl-Imidazol (2-4), während Chymotrypsin die gleiche Verbindung zwar ebenfalls unter Bildung eines Acetyl-Intermediates hydrolysiert, aber als Acyl-Akzeptor nicht den Imidazol-Ring einer Histidin-Seitenkette sondern ein reaktives Serin-Hydroxyl einsetzt (5).

Die Reaktionswege, die von identischen Ausgangsstoffen zu identischen Endprodukten führen, sind hier für die enzymatische Hydrolyse und die nichtenzymatische Modell-Reaktion durchaus verschieden und dürfen nicht miteinander verglichen werden.

Unter den Enzymen sind die Endopeptidasen und die Esterasen bezüglich ihres Reaktionsmechanismus und des aktiven Zentrums gut untersucht.

Über die Exopeptidasen ist sehr viel weniger bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Anhaltspunkte für einen möglichen Reaktionsmechanismus der Aminopeptidase M, einer partikelgebundenen Exopeptidase, zu gewinnen.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Die Substrat-Spezifität der Aminopeptidase M

Mit der Einführung der Aminosäure-Arylamide, L-Leucin- β -Naphthylamid (7) und L-Leucin-4-Nitranilid (8), als Substrate für die L-Leucinpeptid-Hydrolase E.C. 3.4.1.1, wurden diese Chromogene häufig zur Bestimmung einer Leucin-Aminopeptidase-Aktivität im Serum und im Harn, aber auch für histochemische Untersuchungen an Organschnitten, herangezogen.

Es sind jedoch zunehmend Befunde bekanntgeworden, die eine angenommene Substratspezifität der Leucinaminopeptidase widerlegend, zeigten, daß eine Vielzahl von Enzymen, darunter sogar Endopeptidasen (9), die Hydrolyse dieser Substrate katalysieren kann.

Zur abgrenzenden Diskriminierung von der sogenannten "echten" oder "klassischen" Leucinaminopeptidase (L-Leucinpeptid-Hydrolase E.C. 3.4.1.1) wurden die Bezeichnungen:

A r y l a m i n o p e p t i d a s e (10)

L e u c y l - N a p h t h y l a m i d - H y d r o l a s e (11)

A m i n o s ä u r e - N a p h t h y l a m i d a s e (12) und

A m i n o s ä u r e - A r y l a m i d a s e (13)

vorgeschlagen und leider auch benutzt. Kürzlich wurde die Aminopeptidase M ohne Angabe von Gründen mit der länger

bekannten, bereits klassifizierten, Amino-acyl-oligopeptid-Hydrolase E.C. 3.4.1.2 gleichgesetzt.

Sowenig man aus der Tatsache, daß Chymotrypsin den aktivierten Ester 4-Nitrophenylacetat um Größenordnungen schneller spaltet als jede Peptid-Bindung, ernstlich diskutieren würde, die Kennzeichnung "Nitrophenylacetat-Hydrolase" für dieses Enzym herzuleiten, so sehr sollte man vermeiden, einem Enzym durch nominalistische Verknüpfung mit ausgesprochen allo-metabolischen Substraten Spezifitäts-Assoziationen zu unter-schieben, die seinem katalytischen Charakter gar nicht gerecht werden, zumal wenn als Quelle arylamidspaltender Aktivität neben der Aminopeptidase M noch:

A m i n o p e p t i d a s e A (14)

A m i n o p e p t i d a s e B (15)

A m i n o p e p t i d a s e aus B. stearatothermophilus (16)

Aminopeptidase "pH 7,5" aus Rattennieren (17)

A r y l e s t e r a s e (18)

L-Leucin-Peptid-Hydrolase E.C. 3.4.1.1

O c y t o c i n a s e (19)

Aminosäure-Oligopeptid-Hydrolase E.C. 3.4.1.2 und

Acylamid-amido-Hydrolase E.C. 3.5.1.4

in Betracht kommen.

Zur Abgrenzung einer gewissen Substrat-Affinität der Aminopeptidase M unverzweigten L-2-Aminosäure-Amiden gegenüber, wurde die Spaltungskinetik von Amiden bei pH 8.5 und 30°C durch Simultantitration verfolgt.

Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten zeigen einen steilen Anstieg beim Übergang vom Glycin-Amid zum Alanin-Amid hin, fallen dann jedoch nach weiterer Kettenverlängerung, gegen einen Grenzwert konvergierend, wieder ab (Bild 2).

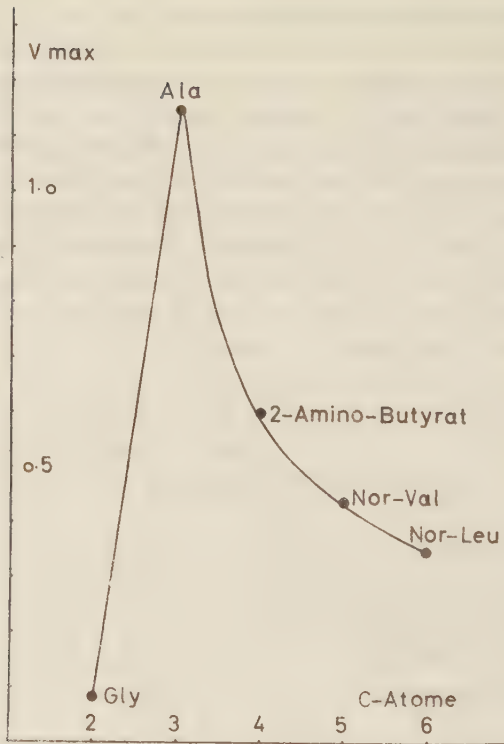


Bild 2 Abhängigkeit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit aminopeptidatischer Spaltung von L-2-Aminosäureamiden von der Länge des Kohlenstoffgerüsts

Ordinate: 10^2 maximaler Substratumsatz (Mol.Liter⁻¹)
Abszisse: Länge der Kohlenstoff-Kette

Simultantitration bei pH 8.5 und T = 30°C

Enzymkonzentration: $5 \cdot 10^{-7}$ M (bezogen auf M.G. $2.8 \cdot 10^5$ bei einer spezifischen Aktivität von 66 I.U.)

Die Michaelis-Konstanten fallen vom Glycin ausgehend steil ab und konvergieren ebenfalls gegen einen Grenzwert. Das Inkrement für die freie Bindungsenthalpie pro Methylengruppe beträgt $- 0.75 \text{ kcal.Mol}^{-1}$ (Bild 3).

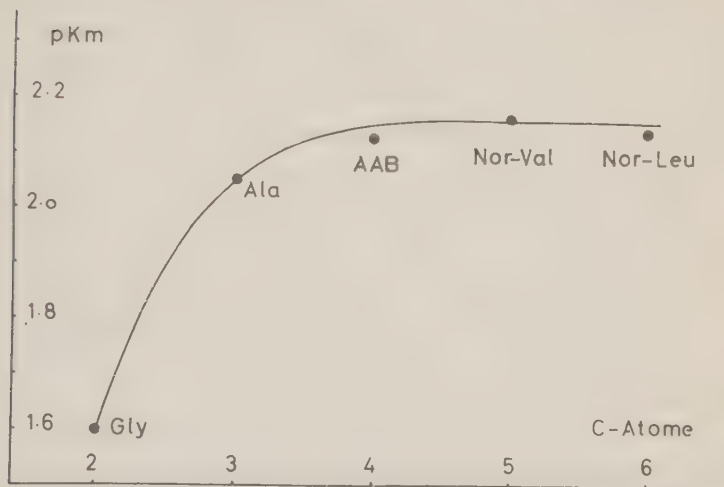


Bild 3 Abhängigkeit der Michaeliskonstanten für die durch Amino-peptidase M katalysierte Spaltung von L-2-Aminosäureamiden von der Länge des Kohlenstoffgerüsts.

Simultantitration bei pH 8.5 und $T = 30^{\circ}\text{C}$

Enzymkonzentration: $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (bezogen auf M.G. $2.8 \cdot 10^5$ bei einer spezifischen Aktivität von 66 I.U.)

Das gleiche Verhalten zeigen die Hemmkonstanten von L-Aminosäuren mit steigender Länge der aliphatischen Kette. Das Inkrement für die freie Bindungsenthalpie stimmt mit $- 0.8 \text{ kcal.Mol}^{-1}$ gut mit dem für die Amide bestimmten Wert überein.

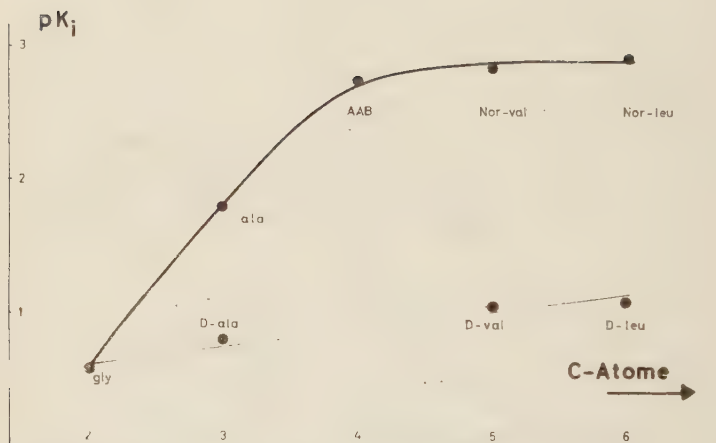


Bild 4 Hemmung der aminopeptidatischen Spaltung von L-Alanin-4-Nitranilid durch D- und L-2-Aminosäuren

0.2M Phosphat-Puffer pH 7,5, T = 25°C

Enzymkonzentration: $4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (bezogen auf M.G. $2.8 \cdot 10^5$ bei einer spezifischen Aktivität von 66 I.U.)

Für die D-Aminosäuren findet man einen linearen Abfall der Hemmkonstanten mit einer freien Bindungsenthalpie von $- 0.25 \text{ kcal.Mol}^{-1}$ pro Methylengruppe (Bild 4).

Die freie Enthalpie der Bindung ist für längererkettige L-Aminosäuren mit der des L-Alanins durchaus vergleichbar. Die hohe Umsatzgeschwindigkeit des L-Alanin-Amids steht jedoch völlig isoliert da und muß wohl dahingehend interpretiert werden, daß die kurze hydrophobe Seitenkette des L-Alanins

aus sterischen Gründen am besten dazu befähigt, eine Transkonformation in Richtung auf den aktivierten Komplex einzuleiten (Prinzip der induzierten Passung (20)).

Für die Annahme hydrophober Wechselbeziehungen zwischen Enzym und Substrat spricht auch die Größenordnung der experimentell ermittelten Inkremente für die freie Bindungsenthalpie pro Methylengruppe, die mit dem berechneten Wert von -0.73 kcal/Mol völlig übereinstimmt. (21)

Derartigen entropiegetriebenen Beziehungen kommt wohl letzten Endes doch nur eine unterstützende Funktion für die Substratfixierung zu.

Die essentielle Funktion einer dem sp^2 -Kohlenstoff direkt benachbarten Aminogruppe für den Verlauf der Substrat-Fixierung und der Substrat-Spaltung zeigt sich in der Unfähigkeit der Aminopeptidase M, die Hydrolyse der 4-Nitranilide von Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Chloressigsäure, Bromessigsäure, 2-Brombuttersäure und β -Alanin zu katalysieren. Für die esteratische Wirkung des Enzyms ist das Vorhandensein einer Aminofunktion am Substrat nicht notwendig.

Lässt man die esteratische Aktivität außer Acht, dann käme für die Aminopeptidase M in Analogie zur L-Leucin-Peptid-Hydrolase auf Grund der eindeutig bevorzugten Spaltung von L-Alanyl-Peptiden in der Enzymnomenklatur die Bezeichnung

L - A l a n i n - P e p t i d - H y d r o l a s e

in Betracht.

Wie im Falle der Leucinaminopeptidase wäre damit jedoch eine unzutreffend strenge Substrat-Spezifität assoziiert.

Es erscheint sinnvoller, sämtliche Aminopeptidasen unter dem Oberbegriff

A m i n o - a c y l - O l i g o p e p t i d - H y d r o l a s e

E.C. 3.4.1.2

zusammenzufassen und dann nach Herkunft oder charakteristischen Eigenschaften durch weitere Kennziffern zu differenzieren.

2.2 Der Einfluß von Metall-Ionen auf das katalytische Verhalten der Amino-peptidase M.

Die polaren Seitenketten von Protein-Molekülen führen zu Wechselwirkungen mit anderen gelösten Elektrolyten.

Metall-Ionen haben daher nicht selten einen ausgeprägten Einfluß auf die katalytische Aktivität von Enzymen.

Über die funktionelle Bedeutung eines Metall-Kations für die enzymatische Reaktion wurden zahlreiche spekulative Ansichten geäußert (22-31), wobei im wesentlichen zwischen Effekten die sich auf Substrate auswirken und solchen die auf das Makromolekül des Proteins einwirken unterschieden werden muß:

METALL-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN UND ENZYMATISCHE AKTIVITÄT

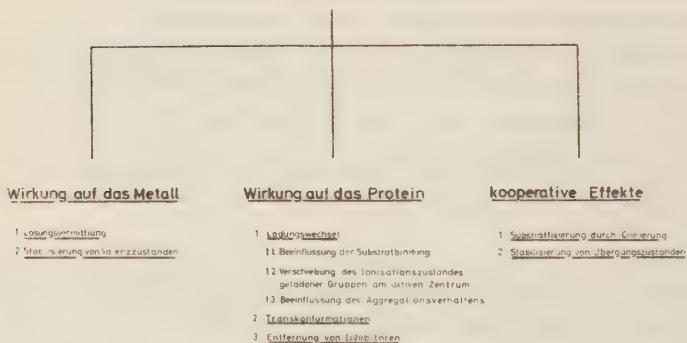


Bild 5 **Auswirkungen von Kationen auf die Aktivität von Enzymen**

Unter diesen Gesichtspunkten erscheint es durchaus zweifelhaft, ob man ein Enzym schon als durch Metallionen aktiviert bezeichnen darf, wenn die enzymatische Aktivität nach Präinkubation mit Kationen gesteigert wird.

Das ist lediglich ein zwar notwendiges, aber noch keineswegs ausreichendes Kriterium, weil das Metall-Ion die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen kann, ohne daß ihm im eigentlichen enzymatischen Mechanismus eine entscheidende Funktion zukommt.

Bei der üblichen Klassifizierung peptidspaltender Enzyme in Serin-Proteasen, Thiol-Proteasen und Metall-Proteasen (32) werden bisher alle näher charakterisierten Exopeptidasen in die Kategorie der Metall-Proteasen eingeordnet (33).

Für die Aminopeptidase M wurde von einer Aktivitätssteigerung um 100% nach Inkubation mit Co(II) berichtet (34). Andere Untersucher stellten dagegen entweder gar keine (35) oder nur geringfügige Aktivitätszunahmen fest (36).

Ein Klärung dieser Diskrepanz ist nicht zuletzt aus systematischen Gesichtspunkten wünschenswert, da grundsätzlich geklärt sein sollte, ob dem in gewisser Weise identischen Wirkungsmuster der Endopeptidasen, wie bisher angenommen, als generell entsprechend korrelatives Verhalten der Exopeptidasen die essentielle Notwendigkeit eines metallischen Kofaktors gegenübergestellt werden muß.

2.2.1 Der Einfluß von Kobalt-(II)-Ionen auf die Aktivität der Aminopeptidase M.

Einstündige Präinkubation einer $4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ Enzymlösung (bezogen auf ein Molekulargewicht von $2.8 \cdot 10^5$ (37) bei einer spezifischen Aktivität von 66 I.U.) in 0.2M Hepes-Puffer pH 7.0 (Hepes = N-2-Hydroxyäthyl-Piperazin-N'-2-äthan-sulfonsäure)(38) bei 25°C zeigt bis zu einer Kobalt-(II)-Ionen-Konzentration von 10^{-4} M keine signifikanten Einflüsse auf die maximale Umsatzgeschwindigkeit. Bei höheren Kobalt-(II)-Konzentrationen tritt eine stark progressive Inaktivierung auf (Bild 6), die nach 24 stündiger Dialyse gegen bidestilliertes Wasser oder

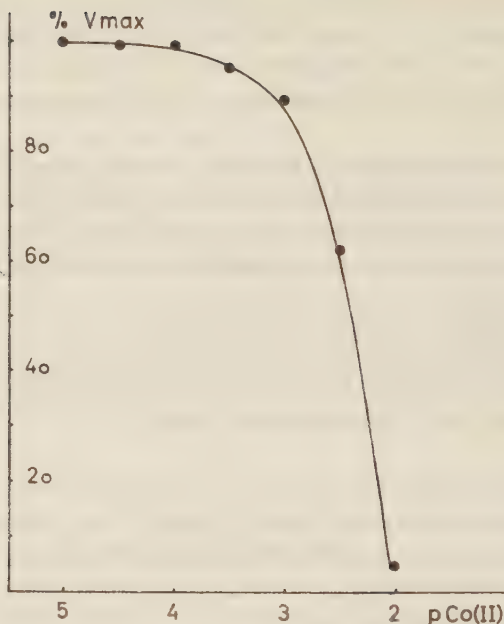


Bild 6 Abfall in der maximalen Umsatzgeschwindigkeit der aminopeptidatischen Spaltung von L-Alanin-4-Nitro-Anilid in Abhängigkeit von der Kobalt-(II)-Ionen-Konzentration
 0.2M Hepes-Puffer pH 7.0, T = 25°C
 Enzymkonzentration: $4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (bezogen auf M.G. $2,8 \cdot 10^5$ bei einer spezifischen Aktivität von 66 I.U.)

Gelfiltration (Sephadex G 10, 120x10 mm, mit 0.2M Hepes-Puffer pH 7.0 äquilibriert) zu 70% aufhebbar ist.

Das Ausmaß der durch höhere Kobalt-(II)-Konzentrationen induzierten Inaktivierung ist zeitabhängig (Bild 7).

Bei weniger reinen Enzympräparationen (spezifische Aktivität 36.6 I.U.) trat bei einer Protein-Konzentration von 0.01 mg/l für Kobalt-(II)-Konzentrationen zwischen 10^{-5} M und 10^{-3} M ein geringfügiger Aktivierungseffekt auf (Bild 8).

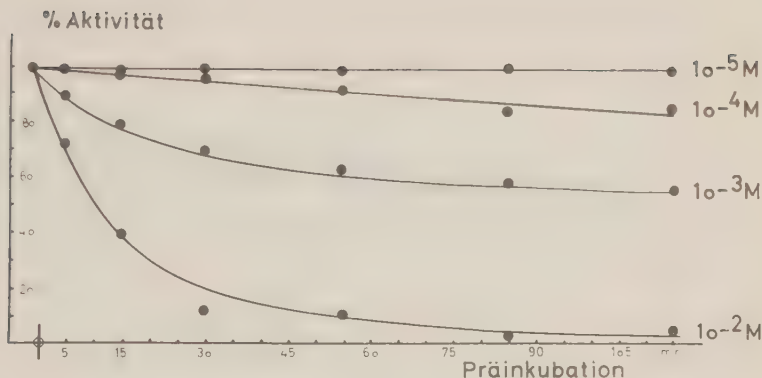


Bild 7 Abfall in der maximalen Umsatzgeschwindigkeit der aminopeptidatischen Spaltung von L-Alanin-4-Nitro-Anilid in Abhängigkeit von der Kobalt-(II)-Ionen-Konzentration und der Präinkubationszeit

0.2M Hepes-Puffer pH 7.0, T = 25 °C

Enzymkonzentration: $4 \cdot 10^{-8}$ M (bezogen auf M.G. $2,8 \cdot 10^5$ bei einer spezifischen Aktivität von 66 I.U.)

Stärker ausgeprägt ist dieser Aktivierungseffekt bei einem extrem ungereinigten Präparat (Aminopeptidase Röhm&Haas, E.L. 10.64, spezifische Aktivität 15.3 I.U.) (Bild 9).

Die diakritischen Angaben über den Effekt von Kobalt-(II)-Ionen auf die peptidatische Aktivität von Aminopeptidase M basieren danach wohl ganz offensichtlich auf Werten, die an Enzympräparationen unterschiedlichen Reinheitsgrades gewonnen wurden.

Man sollte grundsätzlich Befunden über Aktivierungseffekte durch Fremd-Ionen, die für noch weitgehend rohe Enzym-Präparationen mitgeteilt werden, mit genügender Skepsis gegenüber-treten.

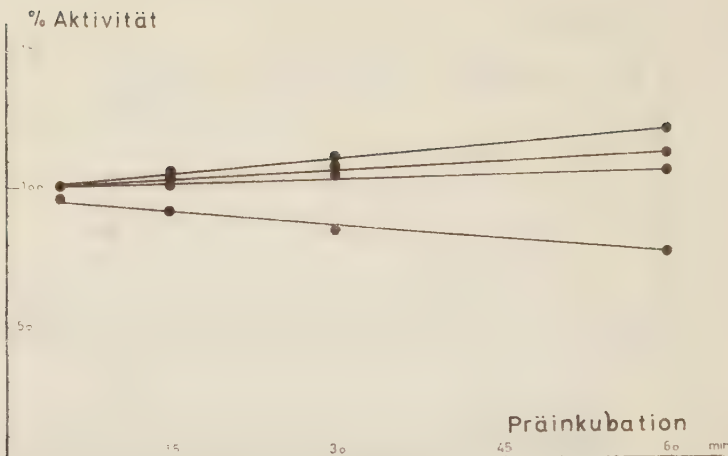


Bild 8 Steigerung der Aktivität wenig gereinigter Amino-peptidase M - Präparationen gegenüber L-Alanin-4-Nitro-Anilid in Abhängigkeit von der Kobalt-(II)-Ionen-Konzentration und der Präinkubationszeit.

Hepes-Puffer, 0.2M, pH 7.0, T = 25°C

Proteinkonzentration: 0.01 mg/ml bei einer spezifischen Aktivität von 36.6 I.U. (ohne Kobalt-(II)-Zusatz).

Die Eliminierung eines dem Enzym-Protein assoziierten Inhibitors, infolge Wechselwirkung mit metallischen Kationen, führt oft zu einer durchaus virtuellen Aktivitätssteigerung.

Frühe Hinweise für derartige Schein-Aktivierungen wurden für die " Zymohexase " (Aldolase = Fructose-1.6-diphosphat-D-Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Lyase E.C. 4.1.2.13) mitgeteilt (39). Unreine Arginase-Präparate werden durch Co(II), Ni(II) und Fe(II) aktiviert (40), das hochgereinigte Enzym zeigt diese Fremdionen-Effekte nicht (41). Auch der Einfluß von Mg(II) auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase hängt stark vom Reinheitsgrad des Enzymes ab (42).



Bild 9 Aktivität unreiner Amino-peptidase-Präparationen in Abhängigkeit von der Konzentration zugesetzter Fremd-Ionen.
 0.2M HEPES-Puffer, pH 7.0, T = 25°C
 Präinkubationszeit: 120 Minuten bei 25°C
 Proteinkonzentration: 0.01mg/ml bei einer spezifischen Aktivität von 15.3 I.U. (ohne Präinkubation mit Metall-Ionen)

2.2.2 Der Einfluß anderer Metallionen auf die Aktivität der Amino-peptidase M.

Der Einfluß von Ionen anderer Übergangselemente zeigt sich, ähnlich wie für Kobalt-(II) beobachtet, in einer ausgeprägten Konzentrationsabhängigen Inhibierung. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Hemmung und der Einordnung der Kationen als harte oder mittelharte Säuren (43) ist nicht erkennbar (Bild 10):

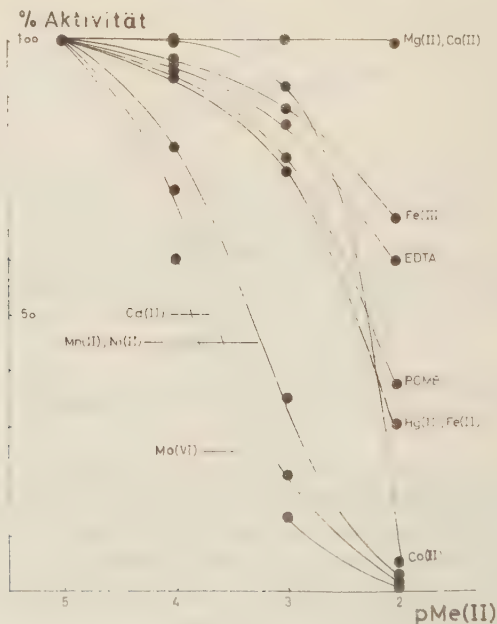


Bild 10 Abhängigkeit der Geschwindigkeit aminopeptidatischer L-Alanin-4-Nitranilid-Spaltung von der Konzentration zugesetzter Fremdionen.
 Enzymkonzentration: $4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (bezogen auf M.G. $2,8 \cdot 10^5$ bei einer spezifischen Aktivität von 66 I.U.)
 0.2M Hepes-Puffer, pH 7.0
 Präinkubationszeit: 120 Minuten, $T = 25^\circ \text{C}$

2.2.3 Der Einfluß von Komplexbildnern auf die Aktivität der Aminopeptidase M.

Inhibierung enzymatischer Reaktionen nach Metall-Entzug gilt als klassischer Beweis für die essentielle Funktion eines Metall-Ions im katalytischen Prozeß (44).

Wenn die Entfernung von Metall-Ionen zu einem reversiblen Aktivitätsverlust führt, muß das aber noch keineswegs als definitiver Hinweis auf die Koenzym-Funktion eines Metall-Ions gewertet werden.

Hochaktive α -Amylase enthält stets mehrere Calcium-Atome pro Mol Enzym, aber nur ein einziges davon ist für die Aktivität wirklich essentiell (45,46). Die restlichen Calcium-Ionen wirken als Stabilisierungsfaktoren, ohne die das Enzym lediglich in engbegrenzten Temperatur- und pH-Intervallen stabil und unverändert aktiv ist.

Wenn die durch Metallionen-Entzug eingeleiteten desaktivierenden Transkonformationen dann noch völlig reversibel sind, kann kaum zwischen einer Stabilisierung und echter Aktivierung unterschieden werden.

Die Dialyse hochgereinigter Aminopeptidase M (spezifische Aktivität 66 I.U.) gegen bidestilliertes Wasser (120 Stunden unter 12 stündigem Wechsel der Mediumsflüssigkeit bei +4°C) führte zu keinem Aktivitätsabfall.

Nach Gelfiltration dieser Präparation (Sephadex G 25, 120x10mm, mit bidestilliertem Wasser äquilibriert und eluiert) trat lediglich eine geringfügige Veränderung im UV-Spektrum auf (Bild 11).

Aktivitätsänderungen waren mit der spektralen Verschiebung nicht verbunden.

2.2.3.1 Der Einfluß von Äthylendiamintetraacetat auf die Aktivität der Aminopeptidase M .

Äthylendiamintetraacetat zeigt bei Konzentrationen oberhalb $10^{-3}M$ einer $4 \cdot 10^{-8}M$ Enzym-Lösung gegenüber einen graduell steigenden Hemmeffekt (Bild 10).

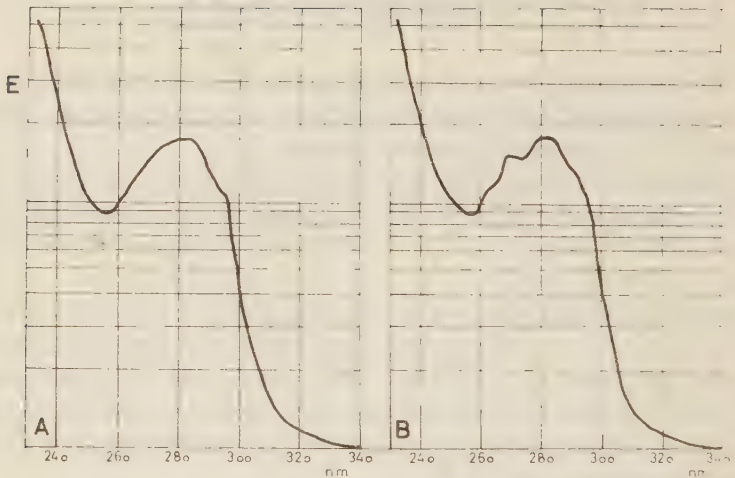


Bild 11 Verschiebung im Protein-Spektrum der Amino-peptidase M nach 120 stündiger Dialyse gegen bidestilliertes Wasser und anschließender Gelfiltration durch Sephadex G 25 (120x10 mm, Äquilibriumierung und Elution mit bidestilliertem Wasser)
A) UV-Spektrum der Amino-peptidase M in bidestilliertem Wasser
B) UV-Spektrum der Amino-peptidase M nach Dialyse und Gelfiltration

2.2.3.2 Der Einfluß von o-Phenanthrolin auf die Aktivität der Amino-peptidase M.

o-Phenanthrolin bewirkt einen zeit- und konzentrationsabhängigen Aktivitätsverlust (Bild-12)

Nach 30 minütiger Präinkubation mit dem Inhibitor zeigte die Hemmkurve einen zunächst nur flachen Neigungswinkel, der im Bereich von Inhibitor-Konzentrationen zwischen $5 \cdot 10^{-4} M$ und $5 \cdot 10^{-3} M$ abrupt aufsteilend, oberhalb $5 \cdot 10^{-3} M$ konvergierend wieder abflacht. Nach Dialyse gegen große Volumina bidestillier-

ten Wassers ist die Phenanthrolin-induzierte Hemmung völlig aufhebbar.

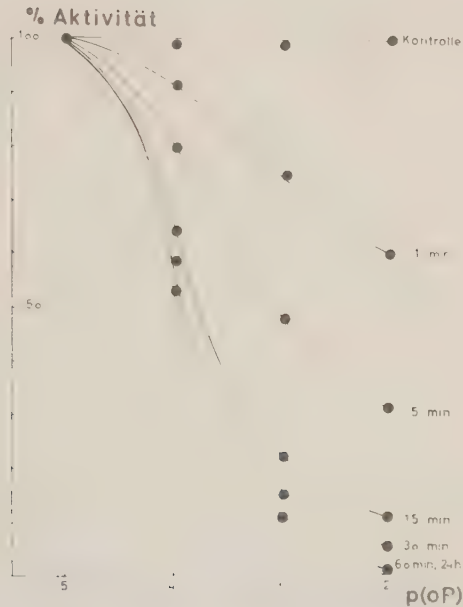


Bild 1 2 Hemmung der Amino-peptidase M durch o-Phenanthrolin
Hepes-Puffer, 0.2M, pH 7.0, T = 25°C
Enzymkonzentration: $4.10^{-8}M$ (bezogen auf M.G. $2.8.10^5$
bei einer spezifischen Aktivität von 66 I.U.)

Einstündige Inkubation phenanthrolininhibierter Amino-peptidase mit geeigneten Kobalt-(II)-Konzentrationen kann die Hemmung teilweise kompensieren (Bild 13).

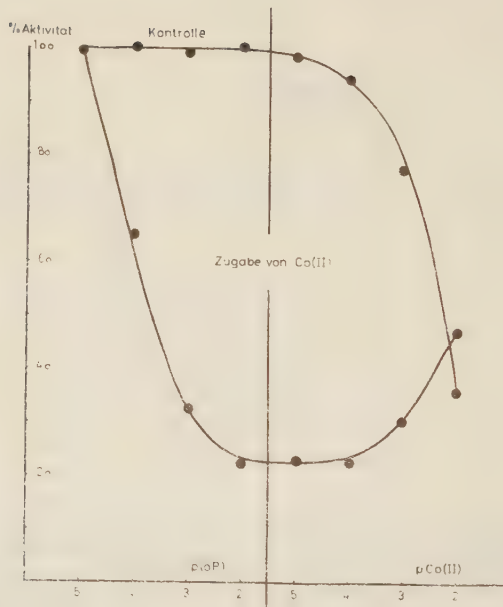


Bild 13 Partielle Reversion der nach einstündiger Präinkubation mit o-Phenanthrolin eingetretenen Aktivitätsabnahme nach gleichlanger Inkubation mit steigenden Kobalt-(II)-Konzentrationen.

Die Kontrolle zeigt den Aktivitätsverlust des nicht durch o-Phenanthrolin gehemmten Enzymes nach Inkubation mit progressiven Kobalt-(II)-Konzentrationen (vgl. Bild 6)

Wird Aminopeptidase M bei pH 7.0 (0.2M Hepes-Puffer) und +4°C 24 Stunden lang gegen eine 10^{-2} M Phenanthrolin-Lösung in 0.2M Hepes-Puffer pH 7.0 dialysiert, dann fällt die Aktivität auf 2.27% des Ausgangswertes. Durch Kobalt-(II)-Ionen lassen

sich maximal 65% der Ausgangsaktivität wiederherstellen, nicht jedoch durch Inkubation mit Kadmium-(II), Nickel-(II), Zink-(II), Mangan-(II), Eisen-(II) und Molybdän-(IV) (Bild 14).

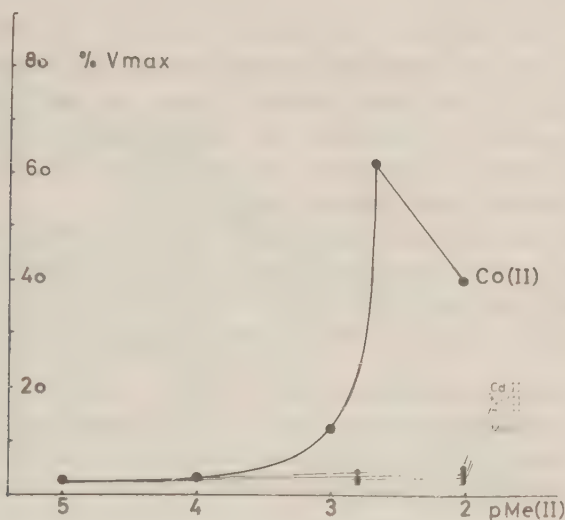


Bild 14 Regenerierung von durch Dialyse (24 Stunden, pH 7.0 +4°C) gegen $10^{-2}M$ o-Phenanthrolin inaktivierter Amino-peptidase M durch einstündige Inkubation mit Kobalt-(II)-Ionen.

Enzymkonzentration: $5.10^{-6}M$ (bezogen auf M.G. $2.8.10^5$)
 0.2M Hepes-Puffer pH 7.0, T = 25°C

Dieser Befund ist umso überraschender, als nach 30 minütiger Präinkubation mit den 3:1 Phenanthrolin-Metall-Komplexen nahezu übereinstimmend eine Restaktivität von 40-65% verbleibt.

2.2.3.3 Der Einfluß von 2,2'-Dipyridyl auf die Aktivität der Amino-peptidase M.

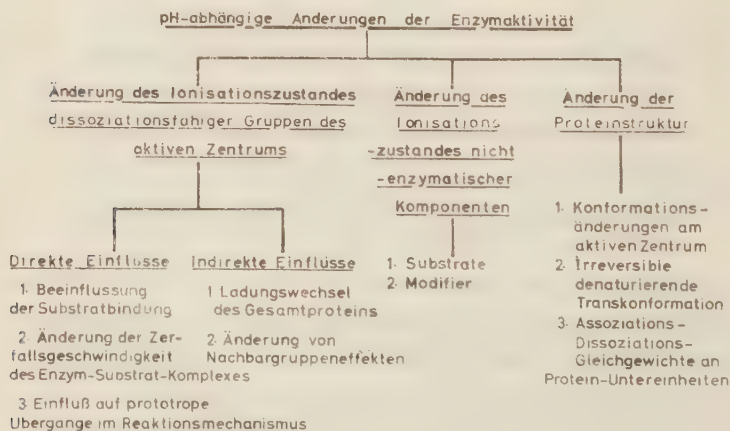
In Bezug auf Hemmeffekt und Reaktivierbarkeit verhält sich Dipyridyl dem Phenanthrolin völlig analog.

2.3 Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Geschwindigkeit der durch Amino-peptidase M katalysierten Hydrolyse von L-Alanin-4-Nitranilid.

Das Auftreten eines Maximums der initialen Umsatzgeschwindigkeit beim Durchlaufen der pH-Skala gehört zu den frühesten Erkenntnissen der Enzymologie und wurde noch vor der Erkennung der Protein-Natur von Enzymen mit der Annahme von reversiblen Dissoziationsgleichgewichten erklärt (47).

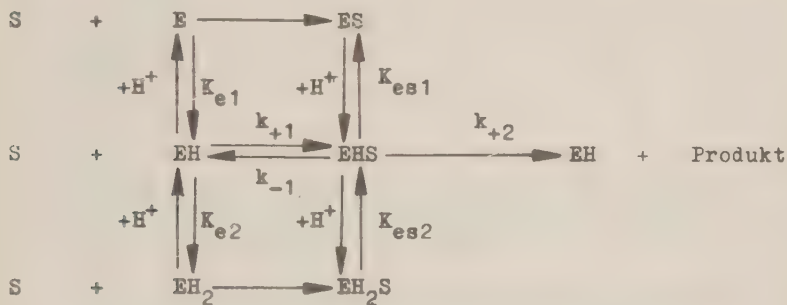
Erweiterte Theorien berücksichtigen auch die ionisierbaren Funktionen am Enzym-Substrat-Komplex (48) und zusätzlich die Ionisierung des Substrates (49), ohne jedoch diesen letzten Fall zu einer praktisch brauchbaren Lösung zu führen.

pH-abhängige Änderungen im katalytischen Verhalten eines Enzymes beruhen keineswegs, wie oft stillschweigend vorausgesetzt, ausschließlich auf einem Wechsel im Ionisationszustand von am aktiven Zentrum beteiligten Funktionen:



Nur dann, wenn die unspezifischen Einflüsse experimentell abzugrenzen sind, liefert die kinetische Theorie irreversibler enzymatischer Einsubstrat-Reaktionen Möglichkeiten zur Identifizierung der am katalytischen Prozeß beteiligten Funktionen.

Unter der Annahme, nur eine definierte ionische Spezies, EH, des als zweibasische Säure dissoziierenden Proteins sei enzymatisch aktiv:



sind die in der "steady-state"-Gleichung (50) auftretenden:

$$v = \frac{V'_{\max}(S)}{K'_M + (S)} \quad (S) = \text{molare Substratkonzentration}$$

experimentell zugänglichen Werte für die maximale Umsatzgeschwindigkeit, $V'_{\max}$, und die Michaelis-Konstante, K'_M , Funktionen der Wasserstoffionen-Konzentration:

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{\frac{1+(H^+)}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{(H^+)}} \quad K'_M = K_M \frac{\frac{1+(H^+)}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{(H^+)}}{\frac{1+(H^+)}{K_{es2}} + \frac{K_{es2}}{(H^+)}}$$

Aus den pH-Abhängigkeiten der mit (-1) multiplizierten, logarithmierten Michaeliskonstanten und der logarithmierten maximalen Umsatzgeschwindigkeit sind die am katalytischen Prozeß beteiligten Funktionen jetzt graphisch zugänglich (51).

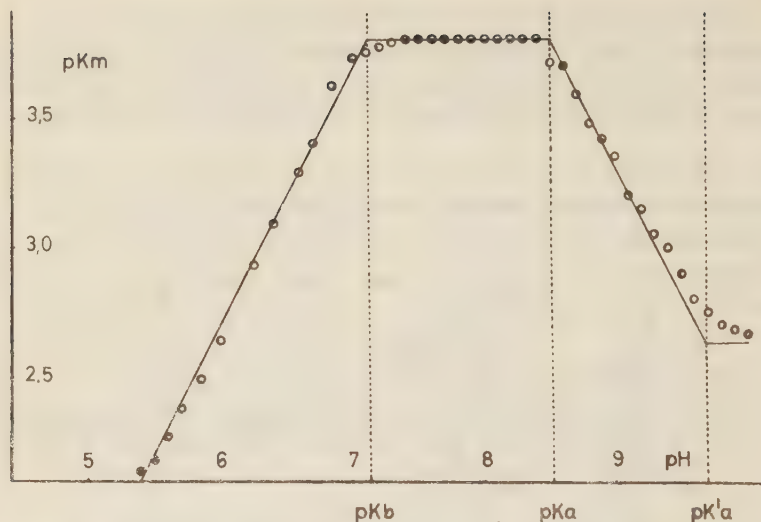


Bild 15 pH-abhängige Änderung der Michaelis-Konstanten
für die durch Amino-peptidas M katalysierte
Hydrolyse von L-Alanin-4-Nitranilid
T = 25°C, Enzymkonzentration: $4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$

Für die Amino-peptidase M sind drei ionisierbare Funktionen
mit den pK-Werten:

$$\text{pK}_1 = 7.2; \quad \text{pK}_2 = 8.5; \quad \text{pK}_3 = 9.7$$

deutlich abgrenzbar (Bilder 15-17).

Die Gruppe mit dem pK-Wert 8.5 muß der Ammonium-Funktion
des L-Alanin-4-Nitranilids zugeordnet werden, die übrigen
Werte beziehen sich auf das Enzym-Protein.

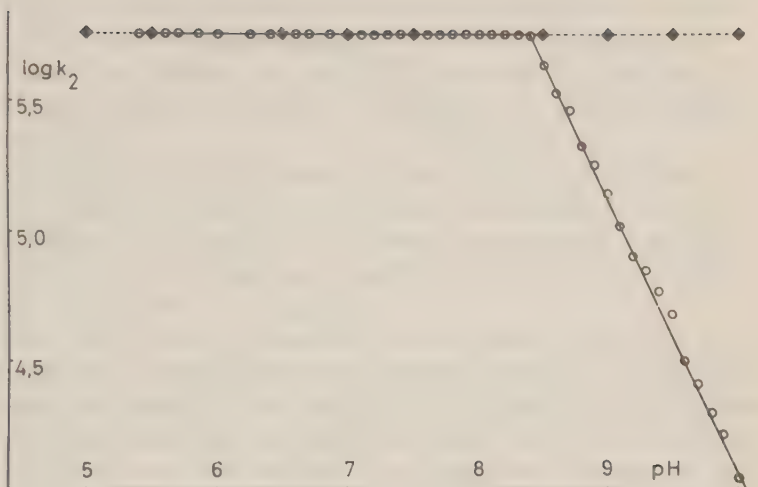


Bild 16 pH-Abhängigkeit der maximalen Spaltungsgeschwindigkeit von L-Alanin-4-Nitranilid bei $T = 25^{\circ}\text{C}$
Enzymkonzentration: $4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (bezogen auf M.G. $2,8 \cdot 10^5$)
Die gefüllten Quadrate symbolisieren Meßwerte, die bei $T = 25^{\circ}\text{C}$ unter den angegebenen pH-Werten jeweils 15 Minuten lang inkubiert wurden. Die Messung der Umsatzgeschwindigkeit erfolgte dann jeweils bei pH 7,0 (Denaturierungs-Kontrolle).
Unterhalb pH 6,5 konnten die Spaltungsgeschwindigkeiten unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht mehr mit genügender Präzision ermittelt werden. Sie bleiben im Diagramm unberücksichtigt.

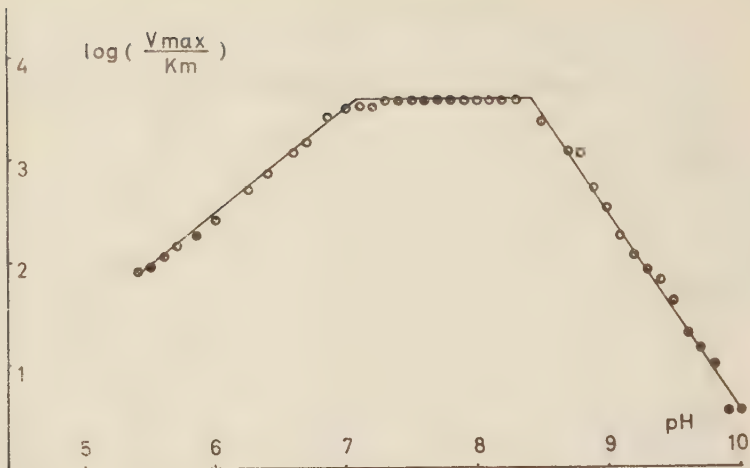


Bild 17 Die pH-Abhängigkeit der logarithmischen Differenz zwischen maximaler Umsatzgeschwindigkeit, $V_{\max}$, und der Substratkonzentration bei der jeweils halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit auftrat, K_M , für die aminopeptidatische Spaltung von L-Alanin-4-Nitranilid
 $T = 25^{\circ}\text{C}$
 Enzymkonzentration: 4.10^{-8}M (bezogen auf M.G. $2,8.10^5$)

Das Auftreten von pK-Werten in der Nähe des Neutralpunktes wird in der Protein-Chemie meist ausschließlich auf die Beteiligung von Histidin (Imidazol-Ring) zurückgeführt, während im Bereich um pK 10 grundsätzlich zwischen phenolischem Hydroxyl, der Epsilon-Amino-Gruppe oder einem aliphatischen Thiol zu unterscheiden ist. Da die Aminopeptidase M keine freien SH-Funktionen enthält (52) kann die letzte Möglichkeit im vorliegenden Falle ausgeschlossen werden.

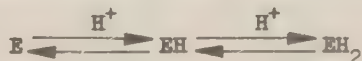
Besonders auffällig ist der pH-abhängige Verlauf der maximalen Umsatzgeschwindigkeit, $V_{\max}$, (Bild 16):

Er wird ganz eindeutig ausschließlich von der Ionisation des Substrates bestimmt, während nach der Theorie irreversibler Binsubstrat-Reaktionen hier einzig und allein die ionisierbaren Gruppen des Enzymsubstrat-Komplexes zum Ausdruck kommen sollten (53).

Wenn oberhalb pH 8.5 die Ammonium-Funktion des Substrates progressiv deprotoniert wird, ist ganz offensichtlich eine Substrat-Fixierung unmöglich; ein reaktionsfähiger Enzym-Substrat-Komplex wird gar nicht gebildet, ein Substrat-Umsatz ist daher auch nicht mehr möglich.

Zur sauren Seite hin ist zwar die Maximalgeschwindigkeit unabhängig von der Wasserstoff-Ionen-Konzentration, nicht aber die Michaelis-Konstante: es besteht eine kompetitive Konkurrenz zwischen Ammonium-Funktion des Substrates und den Hydronium-Ionen der Lösung um eine anionische Bindungsstelle am Protein.

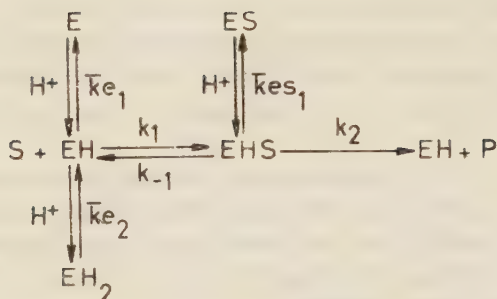
Impliziert man jetzt, daß alle Ionisationsschritte mit gleicher Geschwindigkeit ablaufen, und betrachtet die Gesamt-pH-Abhängigkeit so, als wäre das Substrat nicht ionisierbar, d.h. seine Ammonium-Funktion sei ein integraler Bestandteil des Enzym-Proteins, dann kann der Fall kinetisch behandelt werden, als würde das Enzym in drei Ionisations-Stufen auftreten:



(ohne Berücksichtigung der Ladungsverhältnisse am Protein)

von denen nur eine einzige Spezies, EH, zur Substratfixierung befähigt ist.

Die geladene Funktion am Enzym-Substrat-Komplex (pK 9.7) wird eingeführt mit der Annahme, daß nur ein definierter Ionisationszustand dieser Funktion den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes in Richtung auf die Produkte hin ermöglicht:



Die Gleichgewichtsbedingungen lauten dann:

$$\bar{k}_{e2} (\text{EH}_2) = \bar{k}_{-e2} (\text{EH})(\text{H}^+) \quad (1)$$

$$\bar{k}_{e1} (\text{EH}) = \bar{k}_{-e1} (\text{E})(\text{H}^+) \quad (2)$$

$$\bar{k}_{es1} (\text{EHS}) = \bar{k}_{-es1} (\text{ES})(\text{H}^+) \quad (3)$$

(Die in Klammern gesetzten Buchstaben-Symbole drücken molare Konzentrationen aus)

Definiert man jetzt weiterhin:

$$\frac{\bar{k}_{e1}}{\bar{k}_{-e1}} = K_a; \quad \frac{\bar{k}_{e2}}{\bar{k}_{-e2}} = K_b; \quad \frac{\bar{k}_{es1}}{\bar{k}_{-es1}} = K'_a$$

und setzt diese Ausdrücke in die Beziehungen (1-3) ein, dann ergibt sich:

$$(\text{EH}_2) = \frac{1}{K_b} (\text{EH})(\text{H}^+) \quad (4)$$

$$(E) = K_a \frac{(EH)}{(H^+)} \quad (5)$$

$$(ES) = K'_a \frac{(EHS)}{(H^+)} \quad (6)$$

Für den stationären Zustand ist die Bildungsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes, EHS, definitionsgemäß numerisch gleich seiner Zerfallsgeschwindigkeit:

$$k_1(EH)(S) + \bar{k}_{-es1}(EH)(H^+) - (k_2 + \bar{k}_{es1} + \bar{k}_{-1})(EHS) = 0$$

In Verbindung mit Gleichung (3) resultiert daraus die Beziehung

$$k_1(EH)(S) - (k_{-1} + k_2)(EHS) = 0 \quad (7)$$

Führt man jetzt noch die Bezeichnung K_M für den Quotienten

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

ein, dann ergibt sich aus Gleichung (7) die Beziehung:

$$(EHS) = \frac{(EH)(S)}{K_M} \quad (8)$$

Die allgemeine Erhaltungsgleichung:

$$(E_{Total}) = (E) + (EH) + (EH_2) + (ES) + (EHS) \quad (9)$$

verbindet die einzelnen Enzym-Spezies miteinander:

$$(E_{\text{Total}}) = (EH)\left(1 + \frac{(H^+)}{K_b} + \frac{K_a}{(H^+)}\right) + (EHS)\left(1 + \frac{K'_a}{(H^+)}\right) \quad (10)$$

Aus der Kombination der Gleichungen (8) und (10) erhält man:

$$(E_{\text{Total}}) = (EHS) \frac{K_M}{(S)} \left(1 + \frac{(H^+)}{K_b} + \frac{K_a}{(H^+)}\right) + \left(1 + \frac{K'_a}{(H^+)}\right)$$

Nach Erweiterung mit (S) ergibt sich jetzt die pH-abhängige Umsatzgeschwindigkeit, $v = k_2(EHS)$, als:

$$v = \frac{k_2(E_{\text{Total}})(S)}{K_M\left(1 + \frac{(H^+)}{K_b} + \frac{K_a}{(H^+)}\right) + (S)\left(1 + \frac{K'_a}{(H^+)}\right)} \quad (11)$$

Wird jetzt der erste Differential-Quotient dieser Funktion gleich Null gesetzt:

$$\left(\frac{dv}{d(H^+)}\right) = 0$$

dann resultiert diejenige Wasserstoff-Ionen-Konzentration bei der maximaler Substrat-Umsatz stattfindet:

$$(\text{H}^+)_{\text{optimal}} = \sqrt{\frac{K_b(K_a K_M + K'_a (S))}{K_M}} \quad (12)$$

Der berechnete Wert für Substrat-Konzentrationen in der Größenordnung der Michaelis-Konstanten ergibt sich mit

$$\text{pH}_{\text{optimal}} = 7.86$$

und zeigt damit ausgezeichnete Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten Wert (Bild 18).

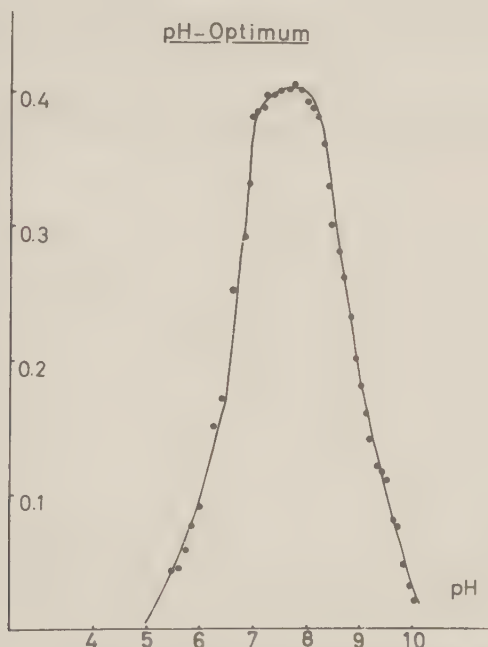


Bild 18 pH-Optimum für die aminopeptidatische Spaltung von L-Alanin-4-Nitranilid.
 Substrat-Konzentration: 2.10^{-4} M
 Enzym-Konzentration: 4.10^{-8} M
 T = 25° C

Es muß nachdrücklich daraufhingewiesen werden, daß die Existenz eines glockenförmigen pH-Abhängigkeit-Profiles (wie es Bild 18 zeigt) noch kein hinreichendes Kriterium dafür ist, die monobasische Form einer in zwei Stufen dissoziierenden Funktion als reaktive Spezies zu betrachten. Die auf- oder absteigenden Äste der Glockenkurve können auch aus einer Kombination der Geschwindigkeitskonstanten von Teilschritten der Gesamt-Reaktion resultieren.

Die pH-Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von o-Carboxy-Phthalimid(54) und Oxazolin (55) zeigt derartige Phänomene.

Auch das pH-Profil einer protonen- oder Hydroxid-Ionen-katalysierten Reaktion wird die Gestalt einer Glockenkurve annehmen. Die Bildung der Stickstoff-Derivate von Carbonyl-Verbindungen gehört zu den biochemisch wichtigen Reaktionen, für die ein derartiges Verhalten beschrieben wurde (56).

Eine glockenförmige pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit kann darüberhinaus auch Ausdruck eines Wechsels im Reaktionsmechanismus sein (57).

2.4 Die Reaktion von Aminopeptidase M mit Diazonium-1-H-Tetrazol (DHT).

Eine absolut spezifische Methode zur direkten Identifizierung von Imidazol als Teil enzymatischer Wirkgruppen ist bisher nicht bekannt.

Man ist vielmehr darauf angewiesen, die durch Kombination verschiedener, weniger spezifischer, Methoden erhaltenen Aussagen kritisch zu werten.

Als gebräuchliche Methoden (58) gelten:

Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität, thermodynamische Untersuchungen zur Dissoziationenthalpie ionisierbarer Funktionen,

photooxidative Inaktivierungen eines Enzyms in Gegenwart von Methylenblau (59) oder Bengal-Rosa (60).

Daß Diazonium-Verbindungen als elektrophile Reagentien den Imidazol-Ring unter Kupplung zu Azofarbstoffen angreifen, ist schon lange bekannt (61).

Neueren Datums ist die Erkenntnis, daß in Proteinen außer Histidin und Tyrosin auch andere Funktionen, meist allerdings ohne charakteristische spektrale Veränderungen, mit Diazonium-Körpern reagieren können (62-64).

Als zur Zeit effektivstes Kupplungsreagens ist in der Proteinchemie das Diazonium-1-H-Tetrazol gebräuchlich.

Das experimentelle Verfahren basiert auf der spektrophotometrischen Bestimmung des gebildeten Histidin-bisazo-1-H-Tetrazols bei 478 nm.

Das Extinktionsmaximum des entsprechenden Tyrosin-bisazo-1-H-Tetrazols liegt bei 550 nm, die Histidin-Verbindung kann also spektrophotometrisch deutlich von der Tyrosin-Verbindung abgegrenzt werden. Dieser Vorteil unterscheidet

das Diazonium-1-H-Tetrazol eindeutig von allen anderen bisher geprüften Diazonium-Verbindungen. Weiter gesteigert wird der Wert des Reagenzes noch dadurch, daß seine alkalischen Zersetzungsprodukte nicht im sichtbaren Bereich absorbieren.

Als schwerwiegender Nachteil muß demgegenüber die extreme Explosionstendenz des Reagenzes, selbst bei Verwendung mäßig konzentrierten Lösungen, abgewogen werden.

Die von den einführenden Autoren (65) mitgeteilte Arbeitsvorschrift, in der die Diazotierungs-Reaktion bei Temperaturen um -10°C vorgenommen werden soll, begünstigt allzuleicht eine, durch Ausfrieren bedingte, Konzentrierung des Reaktionsansatzes, der ohne Vorwarnung plötzlich detonierend, auch in so geringen Mengen wie 0,1 g Diazonium-Verbindung in 4,5 ml Solvens, starkwandige Glasgefäße zertrümmert.

Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 0°C konnte die Explosionstendenz derart gebremst werden, daß die Reagenslösung mindestens 30 Minuten lang stabil und verwendungsfähig blieb.

Ungeachtet dieser stoffbedingten Behinderung des experimentellen Vorgehens hat das Reagens dennoch weitgehende Verbreitung gefunden:

Graduelle Erhöhung der DHT-Konzentration zeigte, daß in nativer Ribonuclease die vier Histidin-Reste in diskreten Schritten kuppeln, während im denaturierten Enzym keine derartige differentielle Reaktivität zu beobachten ist (66). Das Reagens scheint hier zwischen exponierten und vergrabenen Funktionen unterscheiden zu können.

Ähnliche Befunde wurden für das Cytochrom c (67), die Carboxypeptidase A (68), die Glucose-Dehydrogenase (69), Trypsin (65), Lysozym (65) sowie den Soja-Bohnen Trypsin-Inhibitor (70) mitgeteilt.

In allen Fällen sollte die Kupplungsreaktion mit Histidin beendet gewesen sein, bevor es zu einem Angriff auf Tyrosin-

Seitenketten kam, wobei als kritische DHT-Konzentration die beginnende Extinktionszunahme bei 550 nm definiert wurde.

Für die Kupplungsreaktion mit den Modell-Substanzen N-Acetyl-Histidin und N-Acetyl-Tyrosin beobachteten wir in der Tat eine, gegenüber dem hydroxylaktivierten Benzolkern gesteigerte, deutlich höhere Reaktivität des Imidazol-Ringes.

Während N-Acetyl-Histidin bei 10 fach molarem Überschuß des Reagenzes in weniger als 1 Minute vollständig in die Bisazo-Verbindung überführt war, dauerte die Reaktion beim N-Acetyl-Tyrosin länger als 30 Minuten.

Innerhalb von 5 Minuten reagierte N-Acetyl-Tyrosin jedoch unter Bildung der Mono-azo-Verbindung; die Weiterreaktion zur Bisazo-Verbindung ist dann stark retardiert.

Unglücklicherweise liegt jedoch das Extinktionsmaximum des Tyrosin-monoazo-1-H-Tetrazols nicht, wie ursprünglich angegeben (65), bei 380 nm, sondern fällt mit 478 nm exakt in den Bereich maximaler Absorption des Histidin-bisazo-1-H-Tetrazols, ein Befund der inzwischen auch von anderen Untersuchern (71) bestätigt wurde.

Auch die von den einführenden Autoren mitgeteilten molaren Extinktionskoeffizienten waren unrichtig. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (71) wurden für Histidin und Tyrosin im Peptidverband die folgenden Werte benutzt:

	Extinktions- Maximum (nm)	molarer Extinktions- koeffizient
<u>Histidin</u>		
Monoazo-1-H-Tetrazol	360	11500
Bisazo-1-H-Tetrazol	478	21000
<u>Tyrosin</u>		
Monoazo-1-H-Tetrazol	478	5200
Bisazo-1-H-Tetrazol	550	14000

Es ist einigermaßen überraschend, wenn die mit unexakten Extinktionskoeffizienten operierenden Untersucher dennoch bezüglich des Histidin-Gehaltes von Proteinen gute Übereinstimmung mit den Werten der Aminosäure-Analyse gefunden haben, denn ganz offensichtlich ist es nicht zulässig, die nach Reaktion von Proteinen mit Diazonium-1-H-Tetrazol auftretende Extinktionszunahme bei 478 nm ohne weitere Prüfung allein dem Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol zuzuschreiben.

Aminopeptidase M wurde bei Raumtemperatur mit steigenden Konzentrationen Diazonium-Reagenz (mit molarer Äquivalenz beginnend bis zum 10 fach molaren Reagenz-Überschuß) inkubiert. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion unterbrochen dadurch, daß das für die Kupplungsreaktion optimale pH von 8.8 auf 5.0 (hier keine merkkliche Kupplungsreaktion mit Histidin oder Tyrosin) gesenkt und der Reaktionsansatz durch sofortige Gelfiltration über Sephadex G 25 vom Reagenzüberschuß befreit wurde.

Nach spektrophotometrischer Bestimmung des Proteingehaltes (Zeiss Spektralphotometer PM Q 2, 280 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 16.2$) wurden im Eluat die enzymatische Aktivität und der Gehalt an Verbindungen mit Extinktion bei 478 nm bestimmt.

Zwischen dem Verlust an enzymatischer Aktivität und der Extinktionszunahme bei 478 nm zeigt sich eine für den Anfangsbereich lineare Kohärenz, die dann bei höheren molaren Überschüssen des Diazonium-Reagenzes in eine exponentielle Abhängigkeit überging.

Die Hemmkurve kann grob angenähert durch die Funktion

$$\text{Hemmung} = 1 - \left(1 - \frac{n}{8}\right)^2$$

beschrieben werden.

Als "n" ist die Anzahl der pro Mol Enzym ($2,8 \cdot 10^5$) in die Bisazo-Verbindung überführten Histidin-Reste einzusetzen (Bild 19).

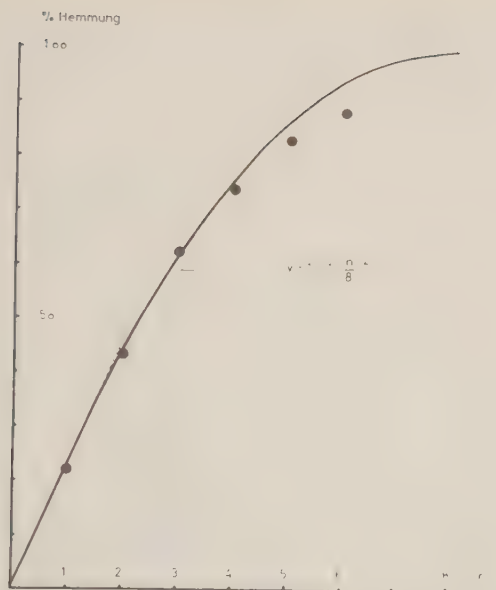


Bild 19 Hemmung der Aminopeptidase M nach Azokupplung mit Diazonium-1-H-Tetrazol
Abszisse: "n" = Anzahl der pro Mol Enzym $(2,8 \cdot 10^5)$ modifizierten Histidin-Reste

Graphische Extrapolation der Initial-Neigung im linearen Teil der Hemmkurve koinzidiert für eine Totalhemmung mit Extinktionswerten, die entweder der Bisazotierung von 4-5 Histidin-Resten pro Mol Enzym oder aber der Monoazotierung von einer Tyrosin-Seitenkette entsprechen (Bild 20)

Der Fingerprint des nach Hitzedenaturierung tryptisch verdauten Azoproteins zeigt nur einen einzigen braunen Fleck (Bild 21).

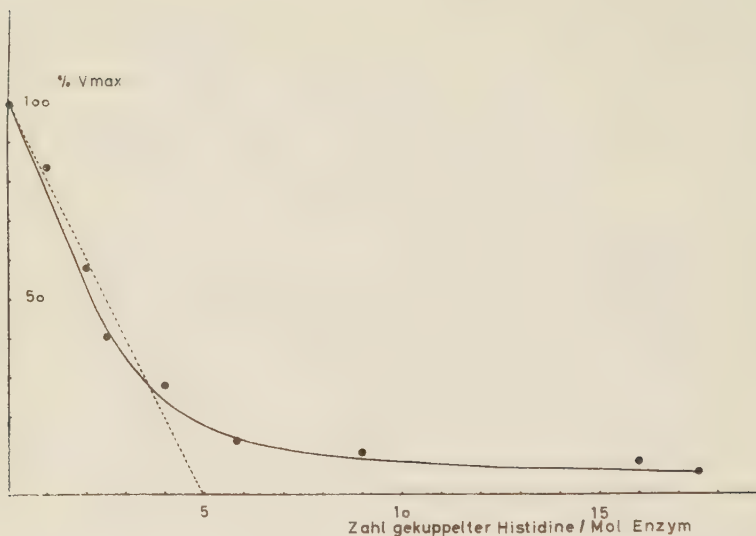


Bild 20 Extrapolation des linearen Anfangsbereiches der nach Azokupplung mit DHT eingetretenen Inhibierung der Amino-peptidase M auf Totalhemmung

Entweder ist also tatsächlich nur ein einziges, "super-reaktives" Tyrosin für die Katalyse notwendig, oder aber das Enzym-Molekül ist aus mehreren, mindestens 4-5, identischen Untereinheiten aufgebaut, in denen jeweils ein essentielles Histidin modifiziert wurde.

Die heutigen Vorstellungen über die makromolekulare Architektur von Proteinen lassen bei einem Molekulargewicht von nahezu $3 \cdot 10^5$ einen Aufbau aus Untereinheiten durchaus erwarten.

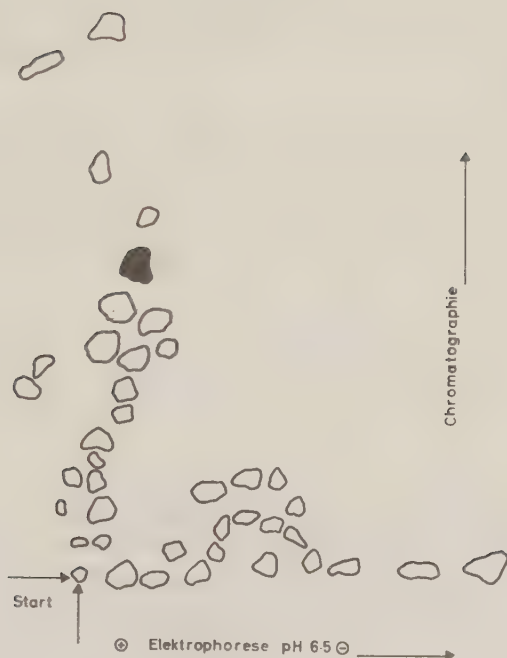


Bild 21 **Fingerprint des hitzedenaturierten Azoproteins
nach tryptischer Verdauung**

(Azoprotein:Trypsin=10:1, pH 8.0, 12 h, 25°C)

Elektrophorese: Pyridinacetat pH 6.5

Chromatographie (Kieselgel-Stärke 20x20 cm):

2-Butanol-Ameisensäure-Wasser (15:3:2, v/v)

Die Wahrscheinlichkeit von Transkriptions- und Translationsfehlern bei der Proteinbiosynthese steigt exponentiell mit wachsender Kettenlänge.

Wenn nun schon bei der Biosynthese der Hämoglobin-Monomeren Ausschuß-Proteine in merkbarem Ausmaß nachgewiesen werden konnten (72), muß dies in erheblich gesteigertem Maße zutreffen, wenn die Kettenlänge auf fast das zwanzigfache vergrößert wird.

Daß die Azokupplung von Histidin-Resten in der Aminopeptidase mit Sicherheit zu einem Aktivitätsverlust führt, zeigen Kurzzeit-Inkubierungen von maximal 1 Minute Reaktionsdauer. Geringe Reagenzüberschüsse führen dabei trotz signifikanter Inhibierung der enzymatischen Reaktion noch nicht zu Änderungen der Absorption bei 478 nm.

Dagegen steigt aber die Extinktion bei 360 nm progressiv mit der Hemmung enzymatischer Effektivität, die Bildung von Histidin-monoazo-1-H-Tetrazol reicht also schon aus zur Blockierung der enzymatischen Katalyse (Bild 22).

Zum beweiskräftigen Nachweis einer ausschließlichen Blockierung von Histidin-Funktionen unter standardisierten Bedingungen, wurden in einem Azoprotein in dem, wie aus der spektrophotometrischen Bestimmung ersichtlich war, 4 Histidin-Reste (bzw. 1 Tyrosin-Rest) reagiert hatten, die Disulfidbrücken mit Natriumborarat gespalten (73) und die freigesetzten Thiolfunktionen mit Jodessigsäure carboxymethyliert (74). Nach Entfernung des überschüssigen Jodessigsäure mit β -Mercaptoethanol und anschließende Dialyse gegen bidestilliertes Wasser wurde das Dialysat lyophilisiert und der Rückstand durch Gelfiltration über Sephadex G 25 weiter gereinigt. Der Gefriertrocknungsrückstand des Eluates aus der Gelfiltration wurde dann einer kombinierten tryptisch-chymotryptischen Verdauung (Proteasen:Azoprotein=1:10) unterworfen.

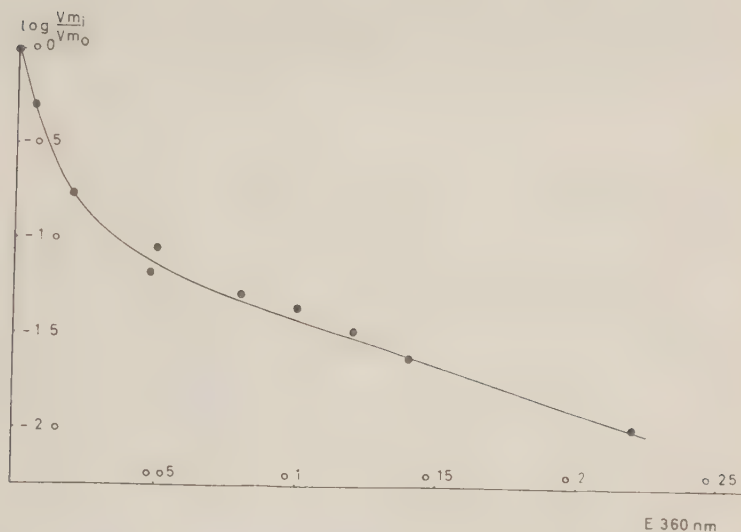


Bild 22 Hemmung der durch Aminopeptidase M katalysierten Spaltung von L-Alanin-4-Nitranilid nach Bildung von Histidin-monazo-1-H-Tetrazol ($\lambda_{\max} = 360 \text{ nm}$)

Nach Ausfällung der proteolytischen Enzyme durch kurzfristiges Erhitzen wurde das in Lösung verbliebene Peptidgemisch nach erfolgter Volumeneinengung über Sephadex G 50 und Sephadex G 25 zunächst vorgetrennt.

Die das Azozeptid enthaltende Fraktion, durch ihre Rotbraunfärbung leicht identifizierbar, wurde dann auf pH 4.0 gebracht und durch Adsorptionschromatographie an Talcum (75) und Aluminiumoxid weiter fraktioniert. Das im alkalischen Medium von der Säule gelöste Azozeptid wurde dann bei pH 7,5 und

Raumtemperatur 12o Stunden lang mit Amino-peptidase M inkubiert (Azo-peptid:Amino-peptidase=1:1).
Nach Einengen des Aminosäuregemisches konnte durch vergleichende Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol identifiziert werden (Bild 23)

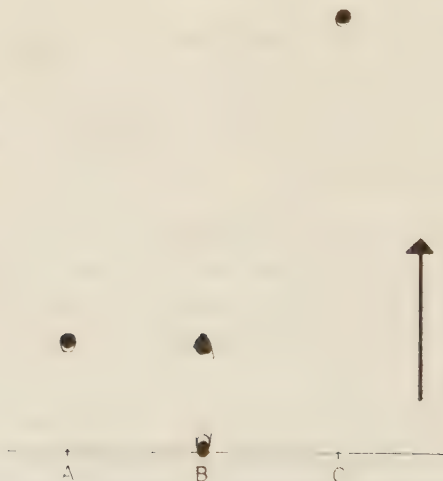


Bild 23 Referenz-Durchlaufs-Chromatographie

A) Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol

C) Tyrosin-monoazo-1-H-Tetrazol

B) Aminosäuregemisch des durch Amino-peptidase M
verdauten Azo-peptids

Aufsteigende Durchlaufs-Chromatographie, Silufol-
Dünnschicht-Fertigplatte, 12 Stunden, Raumtemperatur,
unter völligem Lichtausschluß

Solvens: n-Butanol-Eisessig-Wasser, 4+1+1 (v/v/v)
ohne Kammer-sättigung

Die Referenz-Substanzen wurden durch Mono- oder Bis-Azokupplung der N-acetylierten Aminosäure gewonnen. Nach Abtrennung des Reagensüberschusses durch Verteilungs-chromatographie an Kieselgel wurden die Aminogruppen durch Inkubation mit Schweinenieren-Acylase partiell freigesetzt. Acetylierte und entacetylierte Verbindungen konnten leicht durch präparative Dünnschichtchromatographie getrennt werden.

2.5 Die Reaktion von Amino-peptidase M mit Tetranitromethan

Der nach Einwirkung von Jod auf Amino-peptidase M eintretende Aktivitätsverlust wurde auf die Modifikation von Tyrosin-Resten im Enzym zurückgeführt, da im Säurehydrolysat des jodierten Proteins ausschließlich Mono- und Di-Jodtyrosin nachweisbar waren.

Daraus wurde dann weiter gefolgert, daß Tyrosin als Teil des aktiven Zentrums am katalytischen Prozeß beteiligt sein sollte (76).

Nun ist aber Jod aufgrund seines durchaus ambivalenten Charakters als oxidierendes und elektrophiles Reagens nur von äußerst geringer Spezifität.

Es ist kaum möglich, das Ausmaß der Reaktion zwischen Jod und protein-gebundenem Histidin auch nur annähernd abzuschätzen, da keine charakteristischen spektralen Veränderungen auftreten und die modifizierte Aminosäure bei der Säurehydrolyse des Proteins entweder ganz zerstört oder aber völlig regeneriert wird (77).

Für die Ribonuclease und auch für Lysozym konnte die Einwirkung von Jod auf Histidin demonstriert werden (78).

Schwer wiegt der Befund, daß in Peptiden nach erfolgter Dijodierung von Tyrosin-Resten die Peptid-Bindung gespalten wird (79).

Auch Disulfid-Brücken werden durch Jodangegriffen. Die dann

intermediär auftretenden Sulfenyljodide sind sowenig hydrolysenbeständig, daß sie sich dem Nachweis im Säurehydrolysat sicher entziehen.

Da die Aminopeptidase M nach Öffnung der Disulfidbrücken ihre enzymatische Aktivität verliert, erscheint es schon allein aus diesem Grunde zumindest voreilig, allein aus dem Nachweis von jodiertem Tyrosin im Säurehydrolysat des inaktivierten Enzymes bereits einen essentiellen Charakter von Tyrosin-Resten für die katalytische Funktion des Enzymes folgern zu wollen.

Zur Klärung der Bedeutung von Tyrosin-Resten für die enzymatische Aktivität der Aminopeptidase M, wurde das Enzym mit Tetranitromethan zur Reaktion gebracht.

Die lange bekannten nitrierenden Eigenschaften des Tetranitromethans (80) wurden schon frühzeitig für die Modifikation von Proteinen genutzt (81).

Die Spezifität des Reagenzes ist relativ hoch (82): neben der Oxidation von Thiofunktionen ist die Mono-Nitrierung von Tyrosin-Resten in 3-Stellung der Haupteffect des Reagenzes. Die kürzlich mitgeteilte, von anderer Seite noch nicht bestätigte, Einwirkung von Tetranitromethan auf Tryptophan (83) mindert den Wert des Reagenzes nicht wesentlich, da keine spektralen Veränderungen auftreten, die mit dem Nitro-Tyrosin-Chromophor überlappen könnten.

Wenn die auf o-Nitrierung beruhende Extinktionszunahme bei 428 nm mit der Aktivitätsabnahme parallel geht, darf man annehmen, daß Tyrosin-Seitenketten für die Funktion des Enzymes bedeutungsvoll sind.

Nach einstündiger Inkubierung von Aminopeptidase M mit steigenden Tetranitromethan Konzentrationen bei Zimmertemperatur und pH 8.0 zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen Aktivitätsabnahme und Extinktionszunahme bei 428 nm, wenn der

Reaktionsansatz durch Gelfiltration über Sephadex G 25 (mit 0.2M Pyrophosphat-Puffer pH 7.5 äquilibriert) vom Reagensüberschuß und dem gebildeten Nitroform befreit wurde (Bild 24):

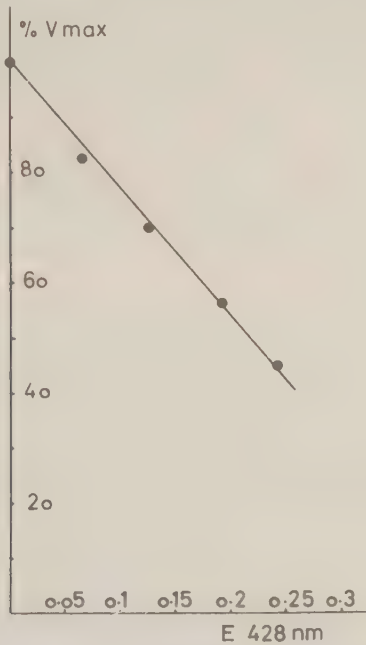


Bild 24 Hemmung der Amino-peptidase M durch
Reaktion mit Tetranitromethan
Inkubation und spektrophotometrische
Titration bei pH 8.0 und $T = 25^{\circ}\text{C}$
Aktivitätsmessung bei pH 7,5, 25°C
Enzymkonzentration: $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$

Der Proteingehalt des Eluates wurde nach der Biuret-Methode bestimmt.

Für höhere Tetranitromethan-Konzentrationen konvergiert die Aktivitätsabnahme bei weiterer Extinktionszunahme (428 nm) gegen einen Grenzwert (Bild 25).

Eine Total-Inaktivierung des Enzymes konnte nicht erreicht werden.

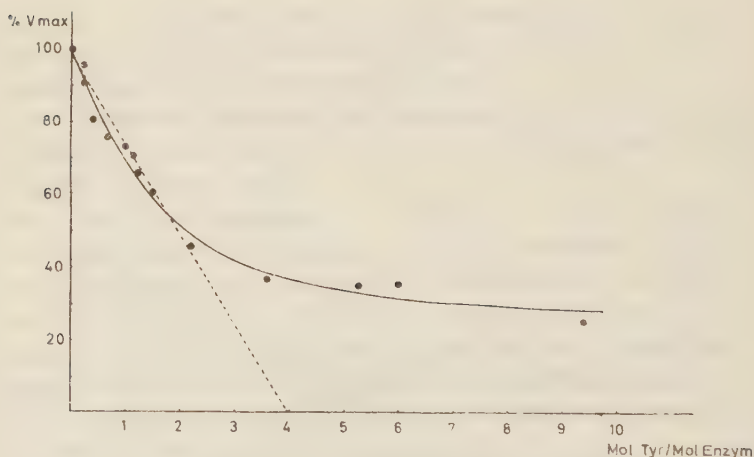


Bild 25 Abhängigkeit der maximalen Spaltungsgeschwindigkeit von L-Alanin-4-Nitranilid von der Anzahl der pro Mol Enzym ($2,8 \cdot 10^5$ g) mononitrierten Tyrosin-Seitenketten

Wird der initiale, lineare Teil der Hemmkurve (Bild 25) auf Totalinaktivierung extrapoliert, dann sollte diese nach

Mono-Nitrierung von etwa 4 Tyrosin-Resten pro Mol Enzym auftreten.

Es wäre hier also eine erstaunliche Übereinstimmung mit dem Verhalten der Aminopeptidase dem Diazonium-1-H-Tetrazol gegenüber festzustellen, wenn eine derartige Extrapolation nicht unzulässig wäre, weil eine Totalinaktivierung praktisch gar nicht zu erreichen ist.

Selbst bei tausendfachem Reagensüberschuß bleibt eine Rest-Aktivität von 25% des Ausgangswertes erhalten.

Der Schnittpunkt der linearen Anfangsneigung der Hemmkurve mit dieser 25%-Linie entspricht dann einer Modifikation von etwa 3 Tyrosin-Resten bei maximal erreichbarer Hemmung.

Der Fingerprint einer zu 50% gehemmten Aminopeptidase zeigt lediglich einen gelben Fleck (Bild 26).

Die markierten Tyrosin-Reste befinden sich augenscheinlich an gleicher Position auf identischen Enzym-Untereinheiten. Im Säurehydrolysat des nitrierten Enzymes lässt sich nur eine einzige gelbgefärbte Verbindung isolieren, die in ihrem chromatographischen (Bild 27) und spektralen Verhalten mit 3-Nitrotyrosin übereinstimmt.

Die aus den vorausgegangenen kinetischen Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der L-Alanin-4-Nitranilid-Spaltung durch Aminopeptidase M (Abschnitt 2.3) vermutete Beteiligung von Tyrosin-Resten am katalytischen Prozeß, kann nach den Ergebnissen der Inhibierungsversuche mit Tetranitromethan als gesichert angesehen werden.

Als mögliche Ursache für den durch Mono-Nitrierung von wenigen, reaktiven Tyrosin-Resten hervorgerufenen Aktivitätsverlust darf eine mögliche Verschiebung des pH-Optimums für die enzymatisch katalysierte Reaktion nicht unberücksichtigt bleiben.

Durch Mono-Nitrierung in 3-Stellung wird der pK-Wert des Tyrosins von 9,7 auf 6.9 erniedrigt. Setzt man diesen neuer



Bild 26 **Fingerprint des hitzedenaturierten Nitroproteins
nach tryptischer Verdauung**
(Nitroprotein:Trypsin=10+1, pH 8.0, 12h, 25°C)
Elektrophorese: Pyridinacetat pH 6.5
Chromatographie (Kieselgel-Stärke 20x20 cm):
2-Butanol-Ameisensäure-Wasser (15+3+2, v/v)

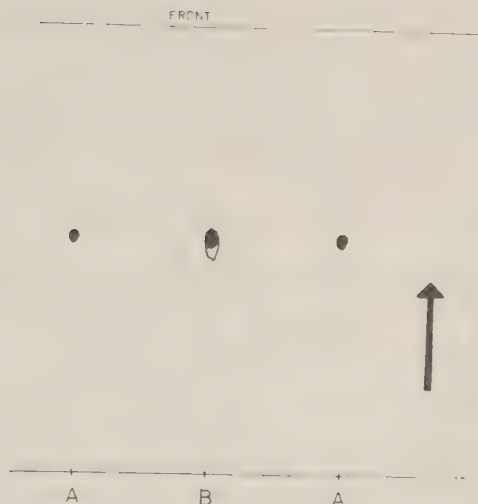
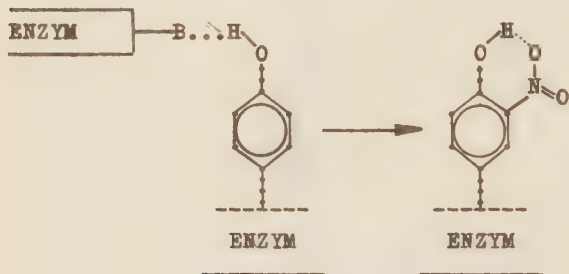


Bild 27 Referenz-Chromatographie
A) 3-Nitro-Tyrosin
B) Säure-Hydrolysat des Nitro-Proteins
Dünnschichtchromatographie, Kieselgel-Stärke
Butanol-2/Eisessig/Wasser (4+1+1, v/v)

Wert als Grundlage für K'_a in Gleichung (11) ein, dann resultiert, in naher Übereinstimmung mit dem Experiment, eine Senkung der pH-abhängigen Reaktionsgeschwindigkeit auf etwa 40% des Ausgangswertes, wobei gleichzeitig das nach Gleichung (12) berechnete pH-Optimum um etwa 0.8 Einheiten auf pH 7.0 zurückgeht.

Wenn die hieraus resultierende Restgeschwindigkeit immer noch 10-15% über der experimentell ermittelten Hemmung liegt, kann diese Differenz dahingehend gedeutet werden, daß die

Raumerfüllung der voluminösen, zum Hydroxyl orthoständigen, Nitrogruppe entweder eine aktivitätsmindernde geringe Änderung in der Architektur des aktiven Zentrums bewirkt, oder aber daß die Konformation des aktiven Zentrums sich durch die nach ortho-Nitrierung zu erwartende Ausbildung von intramolekularen Wasserstoff-Brücken ändert, die dann möglicherweise auch in Konkurrenz zu funktionsnotwendigen intermolekularen Brücken treten könnten:



Die Beeinflussung der Quartärstruktur des Enzymes durch Aziditätsverschiebung ist ebenfalls nicht auszuschließen.

2.6 Die Einwirkung von Phosphorsäureestern auf Aminopeptidase M.

Reaktive Phosphorsäureester acylieren die infolge aktivieren-der Nachbargruppeneffekte erstaunlich nucleophil auftretenden Hydroxyl-Funktionen von Serin-Seitenketten am aktiven Zentrum von vielen Esterasen und Proteasen und führen damit zu völliger Unterdrückung der katalytischen Kapazität.

Bei längerer Reaktionsdauer sollen auch phenolische Hydroxyle angegriffen werden (84).

Die Aminopeptidase M wird weder durch Di-isopropyl-fluor-phosphat noch durch das ähnlich reagierende Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid gehemmt.

Das jedoch die Möglichkeit einer von spontaner Hydrolyse gefolgten O-Phosphorylierung dennoch nicht unbedingt auszuschließen war, ein derartiges Verhalten ist von den A-Esterasen bekannt, wurde Aminopeptidase M zusätzlich noch mit Diäthyl-4-Nitrophenyl-phosphat (E 600, Mintacol soluble) inkubiert.

Das Ausmaß der Reaktion zwischen dem Reagens und dem Protein kann hier leicht durch photometrische Bestimmung des freigesetzten Nitrophenols bei 405 nm verfolgt werden.

Es kam nicht zu einer Reaktion zwischen Aminopeptidase M und dem Phosphorsäureester.

2.7 Die Einwirkung von Halogenketonen auf Aminopeptidase M.

In der Enzymchemie verbinden die zentrums-spezifischen Reagentien die Strukturelemente des Substrates mit aggressiven funktionellen Gruppen. Das für jedes Enzym spezifische

Reagens soll seine Wirkung in zwei diskreten Schritten entfalten:

durch seine strukturelle Verwandschaft mit aktuellen Substraten wird es zunächst an das aktive Zentrum dirigiert und bildet in Analogie zum Enzym-Substrat-Komplex einen reversibel dissoziierenden Enzym-Inhibitor-Komplex.

Im zweiten Reaktionsschritt soll das labil an das aktive Zentrum fixierte Reagens eine kovalente Bindung mit einer Aminosäure-Seitenkette am aktiven Zentrum eingehen.

1-Chlor-3-N-tosylamino-4-Phenyl-Butanon-(2) (= T P C K), in Analogie zum Substrat N-Tosyl-Phenylalanin-äthylester konzipiert, ist ein spezifischer Chymotrypsin-Inhibitor (85). Obgleich Chymotrypsin mehrere Histidin-Reste enthält, wird durch TPCK stets nur ein einziges, immer an gleicher Position befindliches Histidin-Molekül am Aza-Stickstoff alkyliert. Die Reaktion ist deutlich enzymatisch katalysiert: Histidin und Histidin-haltige Peptide werden von TPCK nicht alkyliert. (86).

Weitere Halogen-Methylketone: 1-Chlor-3-N-Carbobenzoxyamino-3-methyl-4-phenyl-Butanon-(2) (87), 1-Chlor-3-phenoxy-Propanon-(2) (88) und 1-Brom-3-phenyl-3-hydroxy-3-brommethyl-Propanon-(2) (89) zeigten ähnliche Eigenschaften.

Aufgrund der Befunde zur Substratspezifität der Aminopeptidase erscheinen das 1-Chlor-3-Amino-Pentanon-(2) sowie das entsprechende Bromketon als geeignete zentrums-dirigierte Inhibitoren.

Die über das Diazoketon geplante Synthese dieser Verbindungen konnte aufgrund bestehender Sicherheitsvorschriften nicht ausgeführt werden.

Da Aminopeptidase M das Estersubstrat 4-Nitrophenylacetat glatt spaltet, für seine esterolytische Effektivität also nicht auf die Anwesenheit einer Ammonium-Funktion am Substrat angewiesen ist, sollten schon einfache Halogenketone schwache inhibitorische Effekte zeigen.

Wurden $1.10^{-6}M$ Aminopeptidase M in $0.2M$ Pyrophosphatpuffer, pH 7,5, mit $3,3.10^{-3}M$ Halogenketon 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur inkubiert, den blieben folgende Rest-Aktivitäten erhalten:

Mono-Chloraceton	79,5% V_{max}
Mono-Bromaceton	45,4% V_{max}
3-Chlor-Butanon-(2)	72,7% V_{max}

Einflüsse auf die Lösungsmittelpolarität wurden dadurch kompensiert, daß das mit gleicher Konzentration des jeweiligen, halogenfreien Methylketons inkubierte Enzym als Referenz-Standard: 100% V_{max} gesetzt wurde.

Jodacetamid und Bromacetamid als ganz ähnlich reaktive Carbonylverbindungen hemmen die Aminopeptidase M nicht. Hier kommen möglicherweise schon wieder hydrophobe Wechselwirkungen zum Ausdruck, insofern als zwar die freie Methylgruppe der Halogenketone an apolare Regionen fixiert werden kann, nicht jedoch die stark polarisierbare Amid-Gruppierung.

2.8 Die Temperaturabhängigkeit der Aminopeptidase-Reaktion

Veränderungen der Wasserstruktur, der Polaritätsparameter, der Ionisations-Potentiale und der spezifischen Konformation prägen den Einfluß der Reaktionstemperatur auf das katalytische Verhalten von Makromolekülen.

Die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen nimmt mit steigender Temperatur zunächst bis zum Erreichen eines "Temperatur-Optimums" zu, sinkt aber jenseits dieses Optimums wieder ab (Bild 28), ein Phänomen, das als Konkurrenz

zwischen temperaturbedingter Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit und progressiv inaktivierender thermischer Transkonformation betrachtet wird (90).

Sieht man die Michaelis-Konstante als Gleichgewichtskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes an, dann kann die Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit (91) darauf angewendet werden:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* = RT \ln K_M$$

$$\ln K_M = \frac{\Delta H^*}{RT} - \frac{\Delta S^*}{R}$$

$$\frac{d(\ln K_M)}{dT} = - \frac{\Delta H^*}{RT^2}$$

$$\frac{d(\ln K_M)}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = \frac{\Delta H^*}{R}$$

(ΔH^* ist die mit der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes verbundene Enthalpieänderung)

Die Aktivierungsenthalpie der Reaktion ergibt sich aus der Temperaturabhängigkeit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit:

$$V_{\max} = \frac{RT}{Mh} \exp\left(-\frac{\Delta H^*}{RT}\right) \exp\left(-\frac{\Delta S^*}{R}\right)$$

Für die Aminopeptidase M zeigt sich die Aktivierungsenthalpie nur für einen engen Bereich als lineare Funktion der Temperatur. Die Bedingungen für eine kinetische Behandlung nach der Michaelis-Menten-Theorie sind oberhalb einer kritischen Temperatur von 40°C nicht mehr gegeben (Bild 29). Möglicherweise beginnt oberhalb dieser Temperatur,

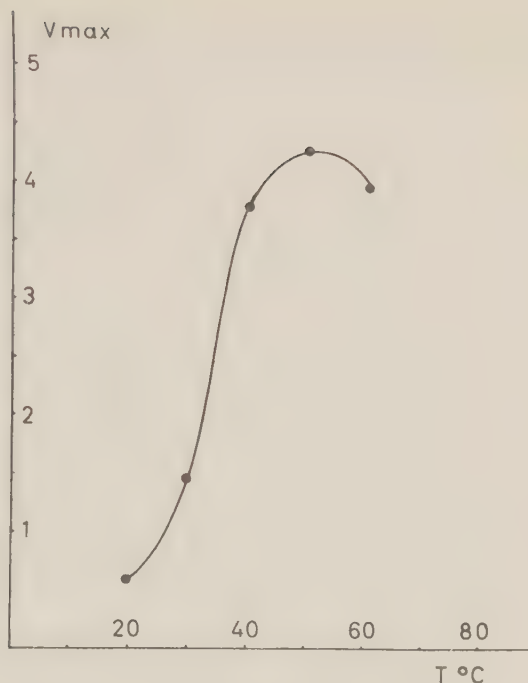


Bild 28 Temperatur-Optimum für die durch Amino-peptidase M katalysierte Spaltung von L-Alanin-4-Nitranilid
0.2M Phosphat-Puffer, pH 7.5

die noch unterhalb des eigentlichen Temperatur-Optimums liegt, bereits eine Dissoziation des Enzyms in inaktive Untereinheiten.

Der gleiche Inflektionspunkt zeigt sich auch in der Temperatur-Abhängigkeit der Michaelis-Konstanten (Bild 30).

Die mit steigender Temperatur zunächst linear anwachsende Michaelis-Konstante ändert sich oberhalb 40°C nur noch wenig.

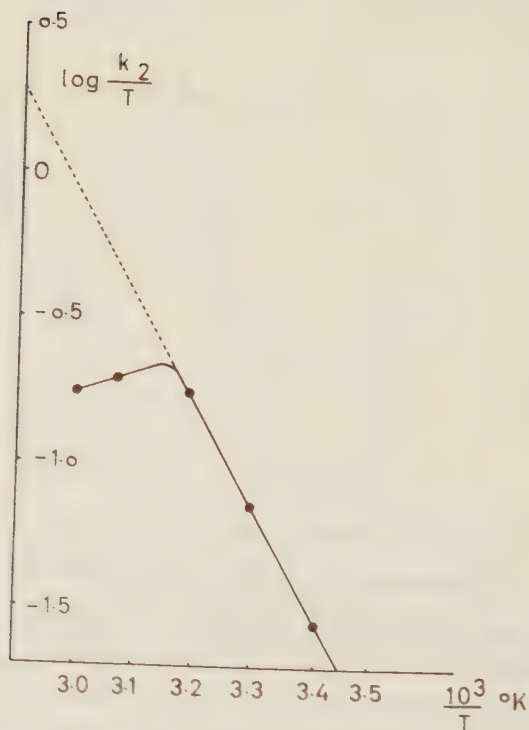


Bild 29 Arrhenius-plot zur Temperaturabhängigkeit der
Maximalgeschwindigkeit aminopeptidatischer Spaltung
von L-Alanin-4-Nitranilid
0.2M Phosphat-Puffer, pH 7.5

Die Aktivierungsenthalpie für die Spaltung von L-Alanin-4-Nitranilid durch Aminopeptidase M liegt mit $16,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ in der für enzymatische Amidspaltungen üblichen Größenordnung.

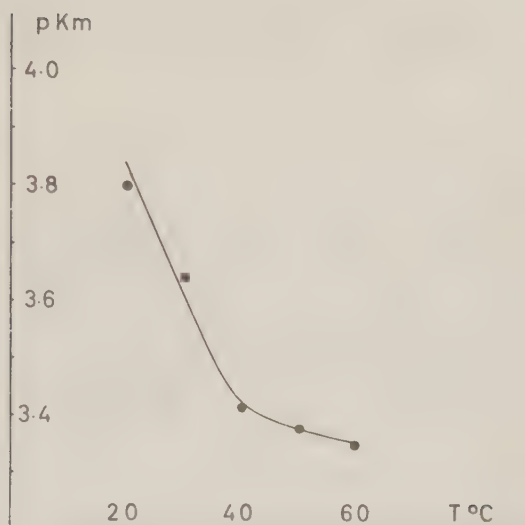


Bild 30 Temperaturabhängigkeit der Michaelis-Konstanten
für die Spaltung von L-Alanin-4-Nitranilid
durch Amino-peptidase M
0.2M Phosphatpuffer, pH 7.5

2.9 Die Topographie des aktiven Zentrums und der Reaktionsmechanismus der Aminopeptidase M.

Bei der Interpretation von Enzymwirkungen müssen grundsätzlich zwei, zwar durchaus verschiedene, aber dennoch nicht voneinander unabhängige Kriterien gewertet werden:

die Spezifität als Unterscheidungsfähigkeit zwischen nahe verwandten chemischen Strukturen und die katalytische Effektivität, die charakteristische Konsequenz, in der die reaktionsgenuinen Elektronen-Umordnungen ablaufen.

Obgleich die Substrat-Spezifität der Aminopeptidase M durchaus nicht stark ausgeprägt ist, neben L-2-Aminosäure-Amiden werden auch die aktivierten Ester aliphatischer Carbonsäuren gespalten, muß für die Amidolyse die Forderung einer protonierten Ammonium-Funktion am Substrat als absolut axiomatisch angesehen werden.

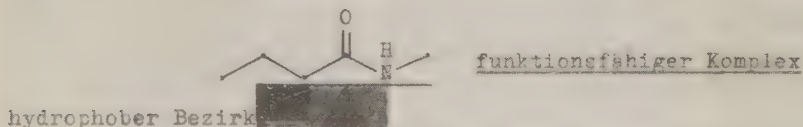
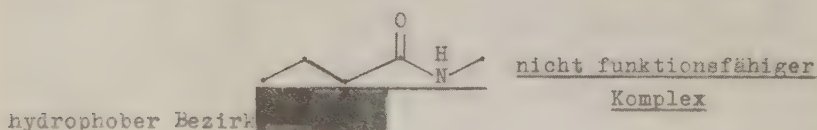
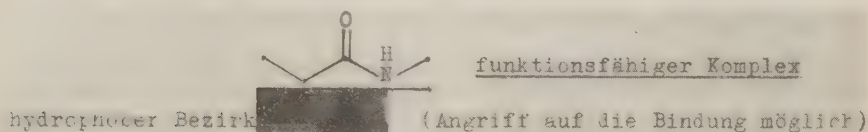
In der Reihe der Aminosäure-Amide ist hinsichtlich der maximalen Umsatzgeschwindigkeit ($V_{\max}$) eine Präferenz für L-Alanin unübersehbar (Bild 3).

Dieser Primat in der Spaltungsgeschwindigkeit liegt aber ebenso offensichtlich nicht in einer besonderen Affinität des Enzyms zum L-Alanin Substrat begründet.

Die Affinitätszunahme beim Übergang vom Glycin-Amid zum weniger hydrophilen L-Alanin-Amid setzt sich bei weiterer Hydrophobiesteigerung nach erneuter Kettenverlängerung nicht weiter fort (Bild 3).

Wenn also, beim Übergang von einem hydrophilen Substrat zu zunehmend hydrophoberen Verbindungen, sich die Differenz in den Bindungsenthalpien nicht mehr ändert, müssen zwar Wechselwirkungen zwischen den Substraten und hydrophoben Bezirken am Enzym-Protein angenommen werden, die hydrophoben Substrate werden vom Enzym gleichsam adsorptiv aus dem wässrigen Lösungsmittel "extrahiert", die Sonderstellung des L-Alanins kann damit dennoch nicht befriedigend erklärt werden.

Wenn man die unmittelbare Nachbarschaft einer kurzen hydrophoben Bindungsregion zum Ort der Bindungsspaltung annehmen will, die durch eine fixierende Konzentrierung und Vororientierung des Substrates die Solvolysengeschwindigkeit steigert (proximity and orientation effect (92)), dann sollte mit zunehmender Kettenlänge der Substrate aus statistischen Gründen die Hydrolysenrate immer stärker abnehmen und sich nicht, wie beobachtet, konvergierend einem Grenzwert nähern.



Die essentielle Notwendigkeit einer 2-Amino-Funktion am Substrat, die wie die Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit zeigen, in ionisiertem Zustand vorliegen muß, macht die Bedeutung dieser Gruppierung für die Substratfixierung evident.

Den zweifellos vorhandenen hydrophoben Wechselwirkungen kommt demgegenüber dann wohl nur noch eine assistierend-orientierende Bedeutung durch Unterdrückung von Bewegungsfreiheitsgraden zu, nachdem das Substrat bereits durch ein anionisches Zentrum an das Enzym fixiert wurde.

Weitere Beweise für die Existenz einer anionischen Wirkstelle liefert die Hemmbarkeit der Amino-peptidase M durch primäre Amine (93).

Schließlich deutet auch der Hemmeffekt von metallischen Kationen auf das Zusammenwirken von geladenen Gruppen.

Bei der Erörterung der katalytischen Effektivität von Enzymen auf der Grundlage gesicherter Reaktionsmechanismen der organischen oder anorganischen Chemie erhebt sich in der Enzymchemie stets die Notwendigkeit, eine erhebliche katalytische Potenz mit vollkommen konventionellen Funktionen zu verknüpfen, die die betrachteten Reaktionen als niedermolekulare Modelle niemals auf enzymatische Größenordnungen zu beschleunigen vermögen.

Modifizierungsversuche und Röntgenstruktur-Untersuchungen haben deutlich gezeigt, daß die Aminosäure-Seitenketten in Proteinen in völlig normaler Form existieren und nicht etwa durch Reaktion untereinander besonders aktive neue Funktionen ausbilden.

Nachbargruppen-Effekte, kovalente, d.h. intramolekulare Katalyse, Ionen-Paar-Wechselwirkungen, Orientierungseffekte und eventuell auch eine Erhöhung von Polarisierbarkeiten infolge Mikroheterogenität der Protein-Oberfläche, müssen als weitere notwendige Erklärungen für die Reaktionsbeschleunigung herangezogen werden, wenn man die enzymatischen Hydrolysen wie mehrfach diskutiert (94), als normale Variationen einer allgemeinen Säure-Basen-Katalyse interpretieren will.

Die Substratspezifität der Amino-peptidase deutet schon darauf hin, daß der Reaktionsmechanismus der durch dieses Enzym katalysierten Amid-Spaltung von dem der Endopeptidasen verschieden ist, eine Annahme die durch die fehlende Hemmbarkeit durch aktivierte Phosphor- und Schwefelsäure-Ester weiter gestützt wird.

Wenn durch chemische und kinetische Untersuchungen das Eingreifen von Histidin- und Tyrosin-Seitenketten in den katalytischen Prozeß gezeigt werden konnte, ist die grundsätzliche Möglichkeit einer kooperativen Imidazol-Tyrosin-Katalyse zu diskutieren.

Histidin, inzwischen als essentieller Bestandteil des aktiven Zentrums von fast allen Enzymen erkannt, kann aufgrund der besonderen Eigenschaften des Imidazol-Ringes bei sehr verschiedenartigen Reaktionen mitwirken.

Es kann sowohl als Protonen-Donator in einer allgemeinen Säure-Katalyse reagieren, als auch im Sinner einer allgemeinen Basen-Katalyse mit dem Wasser, als nucleophiler Partner, in Reaktion treten.

Wenn der basische Aza-Stickstoff unmittelbar am sp^2 -Kohlenstoff eines Carbonyl-Substrates angreift, kann Imidazol eine direkte nucleophile Katalyse bewirken und es kann schließlich auch als Acyl- oder Phosphoryl-Akzeptor an Gruppenübertragungsreaktionen teilnehmen.

Diese besonderen chemischen Eigenschaften des Imidazols erklären sich aus der zyklischen Konjugation eines basischen Aza-Stickstoffs mit einem schwach sauren Imino-Stickstoff. Der Aza-Stickstoff steht als Schwerpunkt negativer Ladung zur Komplexbildung mit Lewis-Säuren und zur Ausbildung von Wasserstoff-Brücken zur Verfügung.

Der schwach azide Wasserstoff des Imino-Stickstoffs kann durch Acyl-Gruppen ersetzt werden.

Von fundamentaler Wichtigkeit ist aber die gegenseitige Vertauschbarkeit dieser Stickstoff-Funktionen durch Protonenübertragung.

Ein einzelnes Imidazol-Molekül ist zwar ohne geeigneten Reaktionspartner nicht in der Lage, ein Proton vom Imino-Stickstoff zum Aza-Stickstoff zu transferieren, wenn es jedoch am Aza-Stickstoff eine Reaktion, als Base, eingeht, der sich eine Dissoziation des Protons vom Imino-Stickstoff

anschließt, dann transformieren die damit verbundenen Elektronen-Umordnungen den ursprünglichen Imino-Stickstoff in einen Aza-Stickstoff, während der ursprüngliche Aza-Stickstoff in einen stabilen Imino-Stickstoff überführt wird. Dieser Reaktions-Zyklus ist die Grundlage für biochemisch wichtige Tansacylierungen.

Über die funktionelle Relevanz des Tyrosins bei enzymatischen Hydrolysen ist sehr viel weniger bekannt.

In der Chymotrypsin-Katalyse scheint Tyrosin bedeutungslos zu sein (95), während seine Beteiligung an der Acetylcholin-Esterase-Reaktion noch problematisch ist (96).

Bei der Carboxypeptidase A führt die O-Acylierung von zwei Tyrosin-Resten zum Verlust der peptidatischen Aktivität bei gleichzeitiger Steigerung der esteratischen Wirkung (97).

In nicht-enzymatischen Amid-Spaltungen, die im allgemeinen nach einem B_{AC2} -Mechanismus verlaufen, ist der elektrophile sp^2 -Carbonyl-Kohlenstoff der Angriffspunkt des Hydroxid-Ions. Es ist nur vernünftig, an dieser Stelle zunächst auch den Angriffspunkt der enzymatischen Spaltung zu suchen, die in einer Verdrängungsreaktion zunächst zu einem intermediären Acyl-Enzym führen sollte.

Ein, prinzipiell vorstellbarer, direkter nucleophiler Angriff des Imidazol-Aza-Stickstoffs auf den Carbonyl-Kohlenstoff von Amid-Substraten, auf Grund der Basizitäts-Unterschiede nicht unmöglich, ist wegen der Resonanzstabilisierung der Amid-Bindung und des hohen Energiegehaltes von Acyl-Imidazolium Verbindungen wenig wahrscheinlich.

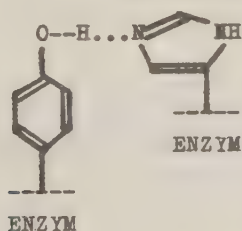
Die imidazolkatalysierte Spaltung einer Amid-Bindung ist auch an Modell-Systemen bislang nicht beobachtet worden. Modellmäßig untersuchte Ester-Spaltungen, für die eine direkte nucleophile Katalyse durch Imidazol bewiesen werden konnte(98) sind nur an labilen "aktivierten" Estern demonstriert worden. Die Esterolyse von N,O-Diacetyl-Serin-Amid verläuft dagegen nach dem Mechanismus einer allgemeinen Basenkatalyse (99).

Die Basizität des Phenolat-Anions reicht dagegen sicher aus, um das schwächer basische Nitro-Anilinium-Ion zu verdrängen, wengleich auch hier, vom thermodynamischen Standpunkt aus gesehen, die Bildung eines labilen Phenolesters (Acyl-Enzym) aus dem energiereichen Amid-Substrat ausgeschlossen werden muß.

Die Diskussion von Reaktionsmechanismen kann sich jedoch nicht allein auf thermodynamische Überlegungen beschränken, sie muß vielmehr die Möglichkeit von kinetisch kontrollierten Reaktionswegen einschließen (100).

Das Carboxylat-Ion ist thermodynamisch zweifellos stabiler als der entsprechende Methylester, dennoch reagieren Carbonsäure-Derivate mit Methanol schneller als mit Wasser und mit dem Methoxid-Ion schneller als mit dem Hydroxid-Ion. Wenn nun Tyrosin den nucleophilen Angriff einleitet, welche Bedeutung kommt dann dem Histidin zu?

Im optimalen Bereich der enzymatischen Katalyse liegt das phenolische Hydroxyl des Tyrosins noch weitgehend unionisiert vor. In unmittelbarer Nachbarschaft eines Imidazol-Kernes ist aber am Protein eine Wechselwirkung des phenolischen Hydroxyls mit dem Imidazol-Azastickstoff denkbar:



Die molare Konzentration der katalytisch wirksamen Spezies "Phenolat-Anion" wird dadurch gleichsam auf höhere Werte gebracht, als aufgrund des pK-Wertes zu erwarten ist.

Die Mononitrierung des Tyrosins erhöht zwar die Azidität des phenolischen Hydroxyls ganz erheblich, führt aber dennoch zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, weil das pH-Optimum um etwa 1 pH-Einheit ins saure Gebiet hinein verschoben ist.

Die Wechselwirkung mit dem Imidazol ist, wegen der erfolgten Dissoziation des phenolischen Hydroxyls und darüberhinaus wohl auch noch infolge sterischer Hinderung durch den raumfüllenden Nitro-Substituenten, blockiert.

Die spezifische Konformation des aktiven Zentrums wird ganz offensichtlich so verändert, daß es zu einer Störung der optimalen Reaktionswege kommt.

Diese Senkung der Reaktionsgeschwindigkeit trotz erheblicher Erhöhung der primär katalytisch aktiven Spezies macht die essentielle Bedeutung von echten kooperativen Effekten während der enzymatischen Katalyse deutlich.

Für die aminopeptidatische Spaltung von Amid-Substraten wird der folgende Reaktionsmechanismus zur Diskussion gestellt, der nur eine allgemeine Basenkatalyse beinhaltet und der, nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität zu fordernden, Symmetrie der Reaktionsfolge durch die Annahme von zwei identischen Übergangszuständen Rechnung trägt:

Nach Fixierung des Substrates durch Zusammenwirken von Ionenpaar-Beziehungen und hydrophoben Wechselwirkungen, unterliegt der elektrophile sp^2 -Carbonylkohlenstoff des Substrates einem nucleophilen Angriff durch das, infolge eines Nachbargruppen-Effektes, "imidazolaktivierte" Phenolat-Anion.

Der durch Imidazol stabilisierte Übergangszustand führt zum intermediären Acyl-Enzym, das als Phenolester infolge einer allgemeinen Basen-Katalyse durch Imidazol unter Rückbildung der nativen Enzym-Struktur gespalten wird.

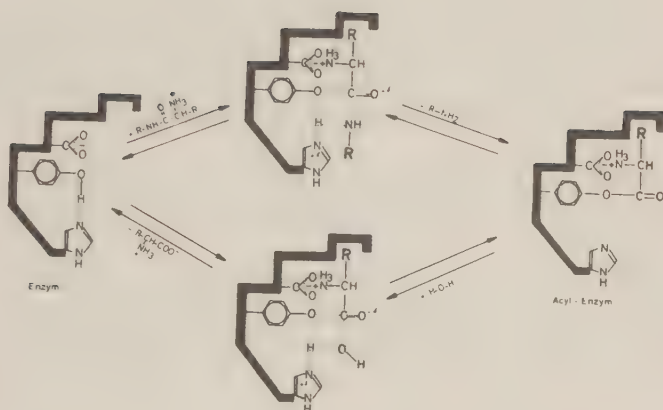
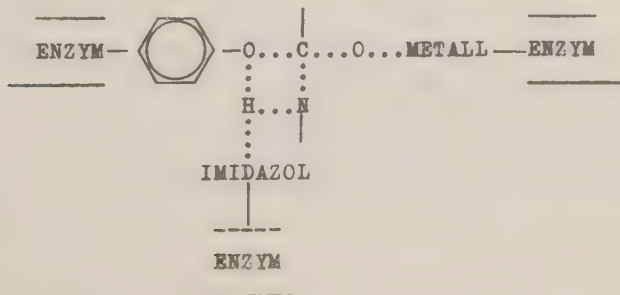


Bild 31 Mechanismus der durch Aminopeptidase M
katalysierten Amidspaltung
(Erklärung: siehe Text)

Wenn die Aminopeptidase M, entgegen unseren Vorstellung, doch ein, dann allerdings extrem fest gebundenes, Metall-Ion, als Bestandteil des aktiven Zentrums, enthält, dann wäre seine Funktion, im vorgeschlagenen Mechanismus, als zusätzlicher Stabilisator der Übergangszustände anzusehen:



- 1) Aminopeptidase M hydrolysiert Amide und Amid-Derivate L-2-Amino-Carbonsäuren.

Die Amide und Amid-Derivate einfacher Carbonsäuren werden nicht gespalten, wohl aber deren aktivierte Ester.

- 2) Innerhalb der Reihe aliphatischer L-Aminosäuren werden die Derivate des L-Alanins bevorzugt gespalten

- 3) Zur Deutung der bevorzugten Hydrolyse von L-Alanin-Substraten ist die Annahme hydrophober Bindungseffekte unzureichend.

Die Möglichkeit einer Substrat-induzierten Transkonformation primär vorhandener, thermodynamisch stabiler aber katalytisch wenig effektiver Tertiärstrukturen in eine katalytisch aktivere Enzym-Spezies wird erwogen.

- 4) Aus der pH-Abhängigkeit der Michaelis-Konstanten und der maximalen Umsatzgeschwindigkeit für die Spaltung von L-Alanin-4-Nitranilid durch Aminopeptidase M, wird auf die essentielle Bedeutung von Histidin- und Tyrosin-Seitenketten für die enzymatische Katalyse geschlossen.

- 5) Die Bis-Azokupplung von 4-5 Histidin-Resten pro Mol enzymatischer Funktionseinheit (M.G. 280 000) mit Diazonium-1-H-Tetrazol führt zum völligen Erlöschen der katalytischen Aktivität.

- 6) Mono-Nitrierung von 2-3 Tyrosin-Seitenketten pro Mol enzymatischer Funktionseinheit (M.G. 280 000) mit Tetranitromethan führt schon zu maximal erreichbarer Inaktivierung. Die Nitrierung weiterer Tyrosin-Reste bleibt ohne Einfluß auf die enzymatische Restaktivität.

- 7) Ein Aktivierungseffekt metallischer Kationen konnte für die Aminopeptidase M nicht nachgewiesen werden. Die katalytische Effektivität des Enzyms beruht offensichtlich ausschließlich auf Aminosäure-Seitenketten-Wechselwirkungen.
- 8) Als möglicher Reaktionsmechanismus wird aufgrund der vorgelegten Befunde eine kooperative Imidazol-Tyrosin-Katalyse zur Diskussion gestellt, für die ein Mechanismus vorgeschlagen wird.

3. Geräte

Für Hochspannungs-Elektrophoresen wurde der Pherograph "Frankfurt" (Hormuth&Vetter) verwendet.

Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten unter Verwendung von LKB Uvicord 4701 A UV-Absorptiometern in Verbindung mit dem Fraktionssammler RadiRac.

Spektrophotometrische Messungen wurden mit den Geräten von ZEISS (PQ M 2) und BECKMANN (DK 10) durchgeführt.

Die Messung der Spaltungsgeschwindigkeit von Aminosäure-4-Nitraniliden wurde in einem EPPENDORF-Photometer (Netheler&Hinz) mit thermostatiertem Küvettenhalter und gekoppelter automatischer Meßbrücke (PHILIPS PR 2210 U) registriert.

Simultantitrationen wurden mit dem Radiometer (COPENHAGEN) durchgeführt.

Die pH-Messung erfolgte potentiometrisch unter Verwendung von Glaselektroden.

4. Methoden

4.1 Kinetische Messungen

4.1.1 Kinetik der 4-Nitranilid-Spaltung

Die Spaltung der Aminosäure-4-Nitranilide wurde durch automatische Registrierung der zeitabhängigen Extinktionszunahme bei 405 nm verfolgt.

Die kinetischen Parameter resultierten, bei stets invariabler Enzymkonzentration, aus der Interdependenz von initialer Reaktionsgeschwindigkeit und Substrat-Konzentration.

Zunächst wurde bei fünf aleatorischen Substratkonzentrationen die Initialgeschwindigkeiten aus dem arithmetischen Mittel von fünf Einzelbestimmungen errechnet, mit deren Hilfe dann über die bekannte EADIE-Lineartransformation der Michaelis-Menten-Beziehung zunächst auf graphischem Wege Approximativwerte für Maximalgeschwindigkeit und Michaeliskonstante

gewonnen werden konnten.

Die weiteren Untersuchungen erstreckten sich dann jeweils über einen einheitlichen Bereich der Substratkonzentration zwischen $0.2 K_M$ bis $3.2 K_M$, entsprechend $0.167 \dots 0.761 V_{\max}$.

Für jede einzelne Substratkonzentration wurden zehn Einzelmessungen unter völlig adäquaten Bedingungen durchgeführt. Durch Einzeichnen in ein Wahrscheinlichkeits-Netz konnten die nicht normalverteilten Werte eliminiert werden.

Die Feinbestimmung der kinetischen Parameter erfolgte dann ausschließlich durch Methoden der statistischen Analyse (101).

Die verschiedenen Initialgeschwindigkeiten, bei konstanter Enzymkonzentration ausschließlich Funktionen der variablen Substratkonzentration, sind von ganz unterschiedlicher Zuverlässigkeit und müssen, wenn das Iterationsverfahren die graphische Auswertung an Genauigkeit übertreffen soll, mit statistischem Gewicht belegt werden. (102)

Geht man von der LINEWEAVER-BURK-Lineartransformation aus:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}(S)} + \frac{1}{V_{\max}}$$

dann ergibt sich die Varianz für die reziproke Geschwindigkeit mit:

$$\text{Var} \frac{1}{v} = \frac{\text{Var}(v)}{v^4} \quad (101).$$

Da bei invariabler Enzymkonzentration die Varianz der Geschwindigkeiten, $\text{Var}(v)$, als homogen angenommen werden kann, resultiert als Wägefaktor einfach die 4. Potenz der jeweiligen Initialgeschwindigkeit (103):

$$w_1 = v_1^4$$

Im weiteren Verlauf des Verfahrens werden zunächst provisorische Werte für die Maximalgeschwindigkeit und die Michaelis-Konstante ermittelt, indem die experimentell

bestimmten Initialgeschwindigkeiten anstelle der unbekannten tatsächlichen Geschwindigkeiten $v = f(S)$ in die Gleichung der Regressionsgeraden eingesetzt werden:

$$v'_{\max} = \frac{\left[\sum v^4 \cdot \frac{v^3}{(S)^2} \right] - \left[\sum \frac{v^4}{(S)} \right]^2}{\sum v^3 \cdot \frac{v^4}{(S)^2} - \sum \frac{v^3}{(S)} \cdot \sum \frac{v^4}{(S)}}$$

$$K'_M = \frac{\left(\sum v^4 \cdot \frac{v^3}{(S)^2} \right) - \left(\sum v^3 \cdot \sum \frac{v^4}{(S)} \right)}{\left(\sum v^3 \cdot \sum \frac{v^4}{(S)^2} \right) - \left(\sum \frac{v^3}{(S)} \cdot \sum \frac{v^4}{(S)} \right)}$$

Diese provisorischen Werte werden dann in eine approximativ linearisierte Michaelis-Menten-Gleichung eingesetzt:

$$v \approx \frac{v_{\max}}{v'_{\max}} \cdot \left(\frac{(S)v'_{\max}}{(S) + K'_M} - (K_M - K'_M) \cdot \frac{(S) \cdot v'_{\max}}{((S) + K'_M)^2} \right)$$

Die Endwerte ergeben sich dann ohne weitere Wägung aus einer bilinearen Regressionsanalyse:

$$v_{\max} = v'_{\max} \frac{\sum -\left(\frac{A}{B^2}\right) \cdot \sum v\left(\frac{A}{B}\right) - \sum \left(\left(\frac{A}{B}\right)\left(\frac{A}{B^2}\right)^2\right)^2 - \sum v \cdot \left(\frac{A}{B^2}\right)^2}{\sum \left(\frac{A}{B}\right)^2 \cdot \sum \left(\frac{A}{B^2}\right)^2 - \sum \left[\left(\frac{A}{B}\right) \cdot \left(\frac{A}{B^2}\right)^2\right]^2}$$

$$K_M = K'_M + \frac{\sum \left(\frac{A}{B}\right)^2 \cdot \sum v\left(\frac{A}{B^2}\right)^2 - \sum \left(\frac{A}{B}\right) \cdot \left(\frac{A}{B^2}\right)^2 \cdot \sum v\left(\frac{A}{B}\right)}{\sum \left(\frac{A}{B^2}\right)^2 \cdot \sum v\left(\frac{A}{B}\right) - \sum \left(\frac{A}{B}\right) \left(\frac{A}{B^2}\right)^2 \cdot \sum v\left(\frac{A}{B^2}\right)^2}$$

$$A = v'_{\max}(S)$$

$$B = (S) + K'_M$$

4.1.2 Die pH-Abhängigkeit der Spaltungskinetik

Die pH-Abhängigkeit der Michaelis-Konstanten und der Maximalgeschwindigkeiten wurde von pH 6.0 bis pH 10.0 in Schritten von 0.1 pH-Einheiten verfolgt.

Den gesamten Untersuchungsbereich hindurch wurde ein Universalpuffer (nach BRITTON und ROBINSON, siehe Abschnitt 6.2) benutzt, der für jeden einzelnen pH-Wert mit Natriumchlorid (Merck, analysenrein) auf einheitliche Ionenstärke eingestellt wurde. Die PH-Werte wurden mit der Glaselektrode eingestellt. Die kinetische Auswertung erfolgte wie unter 4.1.1 beschrieben.

4.1.3 Die Temperaturabhängigkeit der Nitranilid-Spaltung

Die temperaturabhängige Änderung der Maximalgeschwindigkeit aminopeptidatischer Nitranilid-Spaltung wurde in dekadischen Intervallen von +20°C bis +60°C in 0.2M Phosphatpuffer, pH 7,5, im EPPENDORF-Photometer mit thermostatiertem Küvettenhalter verfolgt. Bei jeder Reaktionstemperatur wurden mindestens fünf Einzelmessungen für je fünf Substratkonzentrationen bei stets invariabler Enzymkonzentration, wie unter 4.1.1 beschrieben, durchgeführt.

Der pH der Pufferlösung wurde jeweils, der Meßtemperatur entsprechend, korrigiert.

Vor dem Starten der Spaltungsreaktion durch Enzymzusatz

wurden die verschiedenen Reaktionsansätze im mit dem Meßgerät gekoppelten Thermostaten auf die jeweilige Reaktionstemperatur gebracht, die dann stets unmittelbar in der Küvette gemessen wurde.

Die unter analogen Bedingungen für Pufferkonzentration, pH-Wert, Ionstärke, Substratkonzentration und Temperatur, jedoch ohne Enzymzusatz gemessenen Werte für die Geschwindigkeit der Substrat-Eigenhydrolyse (Wasserhydrolyse) wurden von den experimentell ermittelten Initialgeschwindigkeiten abgezogen.

4.1.4 Die Kinetik der Metallionen-Effekte

Der Einfluß von Metallionen auf die Spaltungskinetik von L-Alanin-4-Nitranilid wurde in 0.2M HEPES-Puffer pH 7.0 (siehe Abschnitt 6.2) bei 25°C untersucht.

Die Metallsalze wurde zu einer 0.1M Stammlösung gelöst und durch Verdünnen mit Puffer auf die jeweils benötigte Konzentration gebracht. Das Enzym, ebenfalls in HEPES-Puffer pH 7.0 gelöst, wurde in solchen Volumina zur gepufferten Metallsalzlösung gegeben, daß die Enzym-Endkonzentration stets $4.10^{-8}M$ betrug.

In einem typischen Ansatz wurden 0.1ml einer $1,2.10^{-6}M$ Enzym-Stammlösung mit 2.9 ml einer $1.10^{-5}M$ Me(II)-Salzlösung 30 Min bei 25°C inkubiert.

Danach wurde durch Substratzusatz gestartet.

Die Auswertung erfolgte entsprechend 4.1.1.

4.2 Bestimmung des Protein-Gehaltes

Der Proteingehalt wurde nach der Biuret-Methode und spektrophotometrisch bestimmt.

4.2.1 Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode

Biuret-Reagens

3.0 Kupfer-II-sulfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) werden in 300 ml bidestilliertem, karbonatfreiem Wasser gelöst und zu einer Lösung von 9.0 Kalium-Natrium-tartrat in 200 ml bidestillier-

tem Wasser gegeben. Dem Gemisch werden dann unter Rühren 16.0 g karbonatfreie, wässrige Natronlauge (50%) und anschließend 5.0 g Kaliumjodid zugesetzt.

Proteinbestimmung

0.1 ml Proteinlösung werden mit 2.5 ml Biuret-Reagenz gemischt und nach 30 Minuten mit bidestilliertem Wasser auf 5.0 ml aufgefüllt. Man mißt in 1cm Küvetten bei 546 nm die Extinktionsdifferenz gegen einen aus 2.5 ml Biuret-Reagenz und 2.5 ml bidestilliertem Wasser bereiteten Blindwert. Der Proteingehalt der Untersuchungslösung (mg/ml) ergibt sich aus der Multiplikation der Extinktionsdifferenz mit dem Faktor 165.

Bei stark verdünnten Protein-Lösungen wurde eine für die Schnellbestimmung des Gesamtproteingehaltes im Liquor cerebrospinalis modifizierte Biuret-Methode (104) benutzt.

Biuret-Reagenz II

1.5 g Kupfer-II-sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) werden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Nach dem Auflösen werden 40 ml Äthylenglykol zugesetzt und bis zur Homogenität der Lösung durch kräftiges Schütteln verteilt.

Unter weiterem starken Schütteln wird dann mit 2N Natronlauge auf 100 ml aufgefüllt.

Proteinbestimmung II

	Leerwert	Standard	Probe
Proteinlösung (ml)	-	-	2.0
bidestilliertes Wasser (ml)	2.0	-	-
Standard-Lösung (ml)	-	2.0	-
Biuret-Reagenz (ml)	0.4	0.4	0.4

Die Messung erfolgt nach 5 Minuten bei 546 nm. Der Farbkomplex ist mehrere Stunden lang stabil.

$$\text{Proteinkonzentration (mg/ml)} = 4,4 \cdot \text{Konz. Standard} \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}}$$

Als Standard-Lösung diente Triglycin (0.418 mg/ml).

Diese Triglycin-Konzentration entspricht bezüglich der Extinktionswerte einer Serum-Albumin-Konzentration von 0.5 mg/ml und ist monatelang extinktionsstabil.

4.2.2 Spektrophotometrische Protein-Bestimmung.

Die spektrophotometrische Bestimmung des Proteingehaltes wurde im ZEISS Spektralphotometer PQ M2 bei 280 nm vorgenommen, unter Verwendung des experimentell ermittelten Faktors:

$$\frac{1\%}{E_{1\text{cm}}} = 16.2$$

4.3 Inkubation von Aminopeptidase M mit

Diisopropylfluorophosphat

10 mg Aminopeptidase M werden in 5.0 ml 0.2M Phosphat-Puffer (pH 7.5) gelöst und mit 0.05 ml einer Lösung von 0.05 ml DFP in 1.0 ml absolutem Isopropanol 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entnahme von 0.5ml Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung, kommen im nächsten Reaktions-Zyklus 0.1 ml, nach weiterer Abnahme von 0.5 ml für die Aktivitätsbestimmung dann 0.2 ml und schließlich 0.4 ml DFP-Lösung zum Einsatz.

Die Blindwerte wurden jeweils mit der entsprechenden Menge Isopropanol inkubiert.

4.4 Inkubation von Aminopeptidase M mit

Phenylmethylsulfonylfluorid

5 mg Aminopeptidase M, gelöst in 5.0 ml 0.2M Phosphat-Puffer (pH 7.0), werden 25 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 0.5 ml einer Lösung von 0.1 g PMSF in 5 ml Isopropanol

inkubiert.

Nach Entnahme von 0,5 ml für die Aktivitätsbestimmung wird nach erneutem Zusatz von 0.5 ml PMSF-Lösung wiederum 30 Minuten lang inkubiert.

Als Aktivitäts-Standard dienten Ansätze mit gleicher Enzym-Konzentration, die, unter sonst adäquaten Bedingungen, lediglich mit Isopropanol inkubiert wurden.

4.5 Inkubation von Aminopeptidase M mit Diäthyl-4-nitrophenyl-phosphat.

0.165 g Mintacol soluble "Bayer" (1.66% Diäthyl-4-Nitrophenyl-phosphat in Natriumchlorid-Verreibung) werden in 5.0 ml 0.2M Phosphat-Puffer (pH 7.0) zu einer Endkonzentration von $2 \cdot 10^{-3} M$ gelöst. Nach Zusatz von $4 \cdot 10^{-8} M$ Aminopeptidase wurde die Extinktion bei 405 nm registriert.

Die Eigenhydrolyse des Phosphat-Esters wurde durch Blindversuche ohne Enzym-Zusatz eliminiert.

4.6 Modifizierung essentieller Histidin-Rest mit Diazonium-1-H-Tetrazol

4.6.1 5-Diazonium-1-H-Tetrazol

0.1 g (0.95mM) 5-Amino-1-H-Tetrazol-Hydrochlorid werden in 2.3 ml 1.6N Salzsäure gelöst, im Eisbad auf $0^{\circ} \dots +1^{\circ} C$ gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit einer eisgekühlten Lösung von 0.07 g Natriumnitrit in 1.5 ml Wasser versetzt.

Die Diazotierung ist nach wenigen Minuten beendet (Tüpfeln mit Kaliumjodid-Stärke-Papier). Wegen der Instabilität der Diazonium-Verbindung im stark sauren Medium wird nach beendeter Diazotierung mit eisgekühlter 50% Kalilauge auf pH 5.0...5.5 eingestellt. Bei kräftigem Rühren im Eisbad ist die Lösung mindestens 40 Minuten lang stabil.

4.6.2 Gehaltsbestimmung

0.01 ml DHT-Lösung (ca. $10^{-4}M$) werden mit 10 ml einer $2 \cdot 10^{-3}M$ Lösung von N-Acetyl-Tyrosin in 0.2M Pyrophosphat-puffer (pH 8.8) gemischt und bei Raumtemperatur 60 Minuten lang stehen gelassen.

Danach wird die Extinktion bei 478 nm gemessen. Der Gehalt der DHT-Lösung resultiert aus der gemessenen Extinktion unter Verwendung des molaren Extinktions-Koeffizienten $E = 5200$.

4.6.3 3-Monoazo-1-H-Tetrazol-N-Carbobenzoxy-L-Tyrosin

0.315 g N-Cbo-L-Tyrosin (1mM) werden in 50 ml 0.2M Pyrophosphat-Puffer (pH 8.8) gelöst und im Eisbad auf $0^{\circ}C$ abgekühlt. Dann werden tropfenweise bei kräftigem Rühren 0.9 Mole Diazonium-1-H-Tetrazol zugegeben. Das pH wird sofort auf 8.8 readjustiert. Nach einstündiger Inkubation bei $0^{\circ}C$ wird der Ansatz noch 2 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit 2N Schwefelsäure auf pH 2.0 gebracht. Der Niederschlag wird abbentrifugiert, in 0.2M Natrium-hydrogencarbonat pH 8.8 gelöst und über Sephadex G10 (äquilibriert mit 0.2M Natriumhydrogenkarbonat pH 8.8) filtriert. Nach Einengen des Eluates wird das Produkt durch Ansäuern ausgefällt und zweimal aus Äthanol-Äther (1+1, v/v) umkristallisiert.

Ausbeute 0.12 g (29%) F.P. $192-194^{\circ}C$

Die Reinsubstanz diente zur Überprüfung des Lambert-Beer-schen Gesetzes im Konzentrationsbereich $1 \dots 10 \cdot 10^{-5}M$.

4.6.4 Kupplungsreaktion

1 ml einer $4 \cdot 10^{-8}M$ Enzym-Lösung in 0.2M Pyrophosphat-Puffer pH 8.8 werden mit steigenden Konzentrationen DHT-Reagenz bei Zimmertemperatur inkubiert, beginnend mit einem fünf-fach molarem Reagenz-Überschuß. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wird das pH auf 5.0 gesenkt und die Reaktionslösung durch Sephadex G25 (äquilibriert mit 0.1M Ammonacetat pH 5.0) filtriert. Im Eluat wird der Proteingehalt nach der Biuret-Methode bestimmt und die Extinktion bei 478 nm gemessen.

4.6.5

Kupplung von Amino-peptidase M mit

5-Diazonium-1-H-Tetrazol im präparativen Maßstab.

100 mg native Amino-peptidase M werden in 5.0 ml 0.2M Pyrophosphat-Puffer (pH 8.8) gelöst und mit 4.10^{-2} M DHT-Reagenz versetzt. Unmittelbar nach der Reagenz-Zugabe wurde das pH auf 8.8 readjustiert. Nach zehnminütiger Reaktion bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mg Resorcin gestoppt. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0°C gekühlt und das Azo-Protein durch tropfenweise Zugabe (aus fein ausgezogener Kapillare) von 60% Perchlorsäure gefällt. Das Präzipitat wurde mehrfach sorgfältig mit Diäthyläther-Aceton (1+1, v/v) gewaschen.

4.6.6

Spaltung der Disulfid-Brücken und
Carboxymethylierung des Azo-Proteins.

4.6.6.1 Spaltung mit Mercaptoäthanol

56 mg Azoprotein werden in 1 ml 10M Harnstoff-Lösung (0.1% EDTA enthaltend) suspendiert. Die Lösung wird auf pH 8.0 gebracht, 2 Stunden lang mit Reinst-Stickstoff durchgast und unter weiterer Stickstoff-Begasung mit 0.05 ml Mercaptoäthanol versetzt.

Man lässt unter ständiger Stickstoff-Begasung bei völligem Lichtausschluss 8 Stunden lang bei Raumtemperatur reagieren und gibt dann eine Lösung von 140 mg Jodessigsäure in 0.5 ml 1 N Natronlauge hinzu. Unter pH-Kontrolle (pH 8.0) lässt man unter Lichtausschluss 6 Stunden lang reagieren und trennt dann das Reaktionsprodukt durch Gelfiltration (Sephadex G25, äquibisiert mit 0.1% Ammonacetat, 2.7 x 50 cm, Säule mit Aluminium-Folie umkleidet) von den überschüssigen Reagenzien.

4.6.6.2 Spaltung mit Natrium-Boranat

28 mg Azo-Protein werden in 2ml 10M Harnstoff-Lösung (0.1% EDTA enthaltend) suspendiert und mit 0.5 ml einer frisch hergestellten Natrium-Boranat-Lösung (25mg/ml) versetzt. Man lässt 120 Minuten bei 45°C reagieren und gibt dann unter völligem Lichtausschluss 100 mg Jodessigsäure hinzu. Nach Adjustierung auf pH 8.0 lässt man unter Lichtausschluss 8 Stunden lang reagieren. Nach Zusatz von 0.5 ml Mercapto-äthanol werden die Nebenprodukte nach weiteren 4 Stunden wie unter 4.6.6.1 beschrieben durch Gelfiltration abgetrennt.

4.7 Nitrierung mit Tetranitromethan

1 ml Enzym-Lösung ($3,2 \cdot 10^{-5}M$) in 0.2M Phosphat-Puffer pH 8.0 werden bei Raumtemperatur mit steigenden Mengen absolut-äthanolischer 1M Tetranitromethan-Lösung 1 Stunde lang inkubiert. Nach Gelfiltration (Sephadex G25, 1,5 x 30cm, mit 0.1M Ammonacetat pH 8.0 äquilibriert) wird der Protein-Gehalt des Eluates nach der Biuret-Methode bestimmt und die Absorption bei 428 nm gemessen.

4.8 Tryptische Verdauung

10 mg Protein werden in 2ml 0.1M Ammonium-hydrogencarbonat Puffer (pH 8.0) suspendiert und mit 1 mg Trypsin bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf von 6 Stunden wird die Verdauung nach erneutem Zusatz von 1 mg Trypsin weitere 6 Stunden lang fortgesetzt.

Durch halbstündiges Erwärmen im siedenden Wasserbad wird die Hydrolyse beendet. Die ausgefallene Protease wird abzentrifugiert, und die gelöste Peptidmischung lyophilisiert.

4.9 Enzymatische Hydrolyse mit Amino-peptidase M

Das zu verdauende Peptid wird in 0.1M Ammon-hydrogencarbonat Puffer (pH 7.5) gelöst und mit 1mg Amino-peptidase M versetzt. Unter dünnschichtchromatographischer Kontrolle des

Spaltungsverlaufes wird bei Zimmertemperatur bis zu 72 Stunden inkubiert.

4.10 Tryptisch-chymotryptische Verdauung

50 mg reduziertes und carboxymethyliertes Azo-Protein werden in 5.0 ml 0.1M Ammon-hydrogencarbonat-Puffer (pH 8.0) gelöst und mit 5 mg Trypsin sowie 5 mg Chymotrypsin bei 37°C 72 Stunden lang inkubiert. Nach Ablauf von jeweils 24 Stunden wird jedesmal erneut die gleiche Menge an Proteasen zugesetzt.

Nach beendeter Verdauung fällt man die proteolytischen Enzyme durch halbstündiges Erhitzen im siedenden Wasserbad.

4.11 Säure-Hydrolyse von Proteinen

5 mg Protein werden mit 0.1 ml 6N Salzsäure in einer zugschmolzenen Ampulle 24 Stunden lang auf 110°C erhitzt. Nach dem Erkalten wird die geöffnete Ampulle in ein Reagenzglas mit seitlichem Saugstutzen überführt. Man evakuiert im Wasserstrahl-Vakuum während das Reagierrohr unter leichtem Schwenken in ein siedendes Wasserbad getaucht wird. Nachdem bis zur Trockene eingedampft ist, führt man durch einen durchbohrten Stopfen eine Glaskapillare bis zu 2/3 der Reagierrohr-Länge ein und saugt 2 Stunden lang Luft durch das auf 100°C beheizte Reagenzglas. Der Rückstand wird in 0.1ml 10% Isopropanol aufgenommen und zur Chromatographie verwendet.

4.12 Inkubation von Amino-peptidase M mit Halogenketonen

Enzym-Stammlösung: $4 \cdot 10^{-8} \text{M}$

Halogenketon-Stammlösungen (acetonisch): $1 \cdot 10^{-1} \text{M}$

	Probe	Standard
Enzym-Stammlösung (ml)	0.1	0.1
0.2M Phosphatpuffer pH 7,5 (ml)	2.8	2.8
Halogenketon-Stammlösung (ml)	0.1	✓
Aceton (ml)	-	0.1

Die Inkubations-Ansätze wurden 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur gehalten.

Aktivitätsbestimmung nach 4.1.1

5. M a t e r i a l

Die benutzten Reagenzien waren von höchster Reinheit, soweit nicht abweichende Reinheitskriterien in den entsprechenden Arbeitsvorschriften ausdrücklich vermerkt wurden. Für chromatographische Zwecke oder als Puffer-Bestandteil verwendete Lösungsmittel wurden vor Verwendung nach bekannten Vorschriften gereinigt und kamen stets frisch destilliert zum Einsatz.

Das zur Prüfung von Metall-Ionen-Effekten verwendete Wasser, (Wasser für Injektionszwecke, DAB 7) wurde frisch aus Ampullen entnommen.

Amino-peptidase M wurde als kommerzielles Produkt von unterschiedlichem Reinheitsgrad und damit unterschiedlicher spezifischer Aktivität bezogen (RÖHM&HAAS, Darmstadt) und durch Gelfiltration über Sephadex G100, G75 und G50 weiter gereinigt.

Die für die vorliegenden Untersuchungen benutzten Präparationen hatten eine spezifische Aktivität von 66 Internationalen Einheiten, bezogen auf L-Alanin-4-Nitranilid bei 25°C und pH 7.5.

Ebenfalls kommerzieller Herkunft waren die Enzyme: Trypsin (serva 37258), Chymotrypsin (Serva 17160) und Schweinenieren-Acylase (Calbiochem B grade 1147)

sowie die Substrate:

L-Leucin-4-Nitranilid (Serva), Glycin-Amid (Calbiochem), L-Leucin-Amid (Serva), L-Alanin-Amid-Hydrochlorid (Schuchardt) und die Reagentien:

5-Amino-1-H-Tetrazol (Schuchardt), Bromaceton (Schuchardt), Chloraceton (Schuchardt), 3-Chlor-2-Butanon (Schuchardt), Diisopropylfluorphosphat (Serva), Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid (Serva), Diäthyl-nitrophenyl-phosphat (Bayer), Tetranitromethan (Fluka), 2,2'-Dipyridyl (Merck), und o-Phenanthrolin-Hydrochlorid (Merck).

Selbst hergestellt wurden die folgenden Substrate und Referenz-Substanzen:

L-Alanin-4-Nitranilid, Essigsäure-4-Nitranilid, Chloressigsäure-4-Nitranilid, Propionsäure-4-Nitranilid, 2-Brompropionsäure-4-Nitranilid, 2-Brombuttersäure-4-Nitranilid, 2-Aminobuttersäure-Amid, Nor-Leucin-Amid, 4-Nitrophenylacetat, N-Carbobenzoxy-3-Monoazo-1-H-Tetrazol-L-Tyrosin, Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol, Tyrosin-3-monoazo-1-H-Tetrazol, 3-Nitrotyrosin.

5.1 Präparative Methoden

L-Alanin-4-Nitranilid

2.2 g (10mM) Carbobenzoxy-L-Alanin (Fluka) werden in eine Lösung von 1.5 g 4-Nitro-Anilin (Fluka) in 25 ml absolutem Tetrahydrofuran gegeben und nach völliger Auflösung mit einer Lösung von 2.5 g Dicyclohexyl-carbodiimid in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran gemischt. Unter gelegentlichem Umschütteln lässt man 24 Stunden lang reagieren und saugt dann vom ausgefallenen Dicyclohexyl-Harnstoff ab. Nach zweimaligem Waschen des Harnstoffs mit je 10 ml absolutem Tetrahydro-

-furan werden die vereinten Waschflüssigkeiten zusammen mit dem Filtrat zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wird in 100 ml Essigester aufgenommen, zweimal mit 1% Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen und über Sikkon (Fluka) getrocknet.

Nach Entfernen des Essigesters im Vakuum bleibt ein langsam durchkristallisierendes gelbes Öl zurück, das in Eisessig gelöst und mit Aktivkohle entfärbt wird.

Nach Abdampfen des Lösungsmittes wird der erstarrte Rückstand aus Äthanol-Äther (1+1, v/v) umkristallisiert.

Ausbeute: 2.7 g (81%) F.p. 101°C

2.5 g Carbobenzoxyl-L-Alanin-4-Nitranilid werden in 25 ml HBr/Eisessig (Merck) bis zur klaren Lösung unter völligem Feuchtigkeitsausschluß gerührt und anschließend in 1000 ml absoluten Äther gegossen (schnell unter kräftigem Rühren). Das L-Alanin-4-Nitranilid-Hydrobromid scheidet sich als dunkles Öl ab. Der Äther wird abdekantiert und das Öl solange mit absolutem Äther gewaschen, bis die Waschflüssigkeit farblos bleibt. Das Öl wird dann in der Kälte mit 50% wässrigem Äthanol digeriert und das Anilid durch Sättigen mit Ammoniak ausgefällt.

Ausbeute: 0.92 g (46%) F.p. 99°C (nach dreitägigem Trocknen über Di-Phosphorpentoxid in der Trockenpistole bei 30°C).

4-Nitrophenyl-acetat

13.9 g (0.1M) 4-Nitrophenol (Hoechst), in 50 ml Benzol, werden mit 10.2 g Acetanhydrid 3 Stunden lang unter Rückflußkühlung erhitzt. Beim Eindampfen kristallisiert das Produkt aus. Umkristallisation aus Äther-Petroläther.

F.p. 81,5°C

Essigsäure-4-Nitranilid

13.8 g (0.1M) 4-Nitro-Anilin (Fluka) werden in 50 ml Benzol mit 10.2 g Acetanhydrid 2 Stunden lang unter Rückflußkühlung erhitzt. Das Produkt kristallisiert schon während der Reaktion aus. Umkristallisation aus Äther-Petroläther.

F.p. 214°C

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der
4-Nitranilide aliphatischer Carbonsäuren.

20 mM Carbonsäure werden zusammen mit 3.3g (24mM) 4-Nitro-Anilin in 50ml Dichlormethan gelöst und nach Abkühlen auf 0°C mit einer eisgekühlten Lösung von 4.1g Dicyclohexylcarbodiimid in 25ml Dichlormethan versetzt. Nach 2 stündigem Rühren im Eisbad wurde der Ansatz 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gehalten, der ausgefallene Dicyclohexyl-Harnstoff abgesaugt, das Filtrat 5 mal mit 1% Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und 2 mal mit Wasser gewaschen, über Sikkon (Fluka) getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Umkristallisation aus Äthanol-Äther (1+1, v/v) unter Zusatz von n-Hexan (in der Wärme) bis zur beginnenden Trübung.

Nach der oben angegebenen Vorschrift wurden die folgenden 4-Nitranilide dargestellt:

Chloressigsäure-4-Nitranilid, F.p. 122°C

Propionsäure-4-Nitranilid, F.p. 186°C

2-Brompropionsäure-4-Nitranilid, F.p. 152°C

2-Brombuttersäure-4-Nitranilid, F.p. 139°C

Tyrosin-monoazo-1-H-Tetrazol

1) N-Acetyl-Tyrosin

Zu einer eisgekühlten Lösung von 5mM L-Tyrosin in 30 ml Wasser werden 2.55 g (25mM) Acetanhydrid gegeben. Das pH der Lösung wird mit Hilfe des pH-Statens auf 7.5 gehalten. Nach 2 stündiger Reaktion wird der Ansatz auf pH 12 gebracht und 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur auf diesem Wert gehalten. Nach Azidifizierung mit 2N Schwefelsäure wird 3 mal mit 25 ml Essigester extrahiert. Die vereinten Auszüge werden mit Wasser gewaschen, über Sikkon (Fluka) getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der feste Rückstand wird 2 mal aus Essigester umkristallisiert.
F.p. 88°C

2) N-Acetyl-Tyrosin-3-monoazo-1-H-Tetrazol

0.23 mg (1mM) N-Acetyl-Tyrosin werden in 50ml 0.2M Pyrophosphat-Puffer, pH 8.8, gelöst, auf 0°C abgekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 0.9 mM 5-Diazonium-1-H-Tetrazol (in Lösung pH 5.0) versetzt. Nach Readjustierung des pH-Wertes auf 8.8 lässt man 15 Minuten lang bei Raumtemperatur reagieren, azidifiziert dann mit 2N Schwefelsäure und zentrifugiert das Präzipitat ab. Durch Alkalisieren (pH 9.0) wird die orangebraune Verbindung gelöst und durch langsames Ansäuern wieder ausgefällt. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt.

3) Tyrosin-monoazo-1-H-Tetrazol

Das Präzipitat wird dann in 0.2M Ammonhydrogencarbonat pH 7.5 suspendiert und 24 Stunden lang mit 25 mg Schweinenieren-Acylase inkubiert. Die Acylase wird dann durch Hitzedenaturierung entfernt. Der wässrige Überstand wird lyophilisiert, in wenig 1% wässrigem Ammoniak gelöst und auf Silufol (Serva) chromatographiert (Lösungsmittelgemisch Nr. 6).

Durch Vergleichschromatographie mit N-Acetyl-Tyrosin-monoazo-1-H-Tetrazol konnte das entacylierte Produkt identifiziert und durch zweimalige präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel-Stärke) rein erhalten werden (Lösungsmittelgemische Nr. 3 und Nr. 6).

Säulenchromatographisch (Kieselgel) war keine vollständige Trennung der acetylierten Verbindung vom entacetylierten Produkt zu erzielen.

Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol

1) N-Acetyl-Histidin

1.2 g L-Histidin werden in 6 ml Eisessig und 1 ml Acetanhydrid gelöst und unter völligem Lichtausschluss 2 Stunden lang unter Rühren auf dem Wasserbad erwärmt. Die abgekühlte Lösung wird mit 10 ml Wasser versetzt und im Vakuum eingedampft. Das Versetzen mit Wasser und anschließendes Abdampfen

werden noch zweimal wiederholt. Nach Lösen in wenig Wasser wurde das Rohprodukt durch Aceton-Zusatz gefällt und zweimal aus Wasser-Aceton umkristallisiert.

F.p. 171.2°C (im Chromatogramm nur ein Pauly-positiver Fleck)

2) N-Acetyl-Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol

0.1g (0.5mM) N-Acetyl-Histidin werden in 50 ml 0.2M Pyrophosphat-Puffer, pH 8.8, gelöst und nach Abkühlung auf 0°C tropfenweise mit 1mM 5-Diazonium-1-H-Tetrazol (in Lösung pH 5.0) versetzt. Nach Readjustierung des pH-Wertes auf 8.8, lässt man 15 Minuten bei 0°C und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur reagieren. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand zweimal mit 5 ml heißem Pyridin extrahiert und in 100 ml absoluten Äther+Petroläther (1+1, v/v) eingetropt. Das ausgefallene rotbraune Produkt wird abzentrifugiert und nach dem Trocknen ohne weitere Reinigung verarbeitet.

3) Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol

Das rohe N-Acetyl-Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol wird in 5 ml 0.2M Ammonhydrogencarbonat-Puffer, pH 7.5, suspendiert und mit 20 mg Acylase (Calbiochem) im Dunkeln bei Zimmertemperatur 36 Stunden lang inkubiert. Das Protein wird durch Erhitzen ausgefällt, abzentrifugiert und der Puffer durch Gefrier-trocknen entfernt. Das Rohprodukt wird in wenig 1% wässrigem Ammoniak gelöst und auf Silufol (Serva) chromatographiert (Lösungsmittel Nr. 6). Durch Vergleichschromatographie mit dem acetylierten Produkt konnte Histidin-bisazo-1-H-Tetrazol identifiziert und durch zweimalige präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel-Stärke) rein erhalten werden. (Lösungsmittelgemische Nr. 3 und Nr. 6).

Spektrophotometrisch konnte im Präparat keine Verunreinigung mit Histidin-monoazo-1-H-Tetrazol festgestellt werden.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von
2-Aminosäure-Amiden.

1) 2-Aminosäure-Ester-Hydrochloride

12 g frisch über Bienenwachs destilliertes Thionylchlorid wird portionsweise unter kräftigem Umschwenken zu einer Suspension von 0.05M 2-Aminosäure in 30ml Methanol gegeben und unter Rückflußkühlung 6 Stunden lang im Sieden gehalten. Das beim Einengen der Lösung auskristallisierende Ester-Hydrochlorid wird aus Methanol-Äther (1+1, v/v) umkristallisiert.

2) 2-Aminosäure-Amide

Das Aminosäure-Ester-Hydrochlorid wird in Methanol suspendiert, auf -10°C abgekühlt und unter ständiger Kühlung bis zur vollständigen Lösung mit Ammoniak begast. Fest verschlossen lässt man den Reaktionsansatz einige Tage bei Zimmertemperatur stehen. Das beim Einengen ausfallende Amid wird aus Methanol-Äther (1+1, v/v) umkristallisiert.

3-Nitro-Tyrosin

0.56g N-Acetyl-Tyrosin (2.5mM) werden in 30 ml 0.2M Pyrophosphat-Puffer, pH 8.0, gelöst und mit einer Lösung von 1.0g Tetranitromethan in 3 ml Äthanol 45 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wird dabei ständig auf 8.0 gehalten. Nach Ansäuern mit 2N Schwefelsäure wird mehrfach mit Essigester extrahiert. Die vereinten Auszüge werden sorgfältig mit Wasser gewaschen, über Sikkon (Fluka) getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird sorgfältig mit Petroläther gewaschen und anschließend aus Essigester umkristallisiert.

F.p. 180°C

Säure-Hydrolyse (6N HCl, 105°C , 24 Stunden) ergab 3-Nitro-Tyrosin als einheitliche, gelbliche, ninhydrinpositive Substanz.

6. Reagenzien - Verzeichnis

6.1 Chromatographie und Elektrophorese

Dünnschichtchromatographische Trennungen wurden auf Silufol-Schichtkarten (Serva) durchgeführt.

Für kombinierte Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie sowie für präparative Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel G (Merck, Darmstadt) und MN-Kieselgel S (Macherey&Nagel, Düren) benutzt.

Als chromatographische Solventien wurden benutzt:

Lösungsmittel Nr. 1 (106)

30.8 ml Methanol, 15.2 ml Ammoniak, 25%, 46ml Benzol,
8 ml Wasser

Lösungsmittel Nr. 2 (107)

120 ml Pyridin, 42 ml Eisessig, 204 ml n-Butanol, 75 ml H₂O

Lösungsmittel Nr. 3

20 ml Chloroform, 20 ml Methanol, 10 ml Ammoniak (25%)

Lösungsmittel Nr. 4 (108)

40 ml n-Butanol, 10 ml Eisessig, 10 ml Wasser

Lösungsmittel Nr. 5 (109)

100 ml n-Butanol, 60 ml 2-Butanon, 20 ml Ammoniak (17%)

Lösungsmittel Nr. 6

100 ml Pyridin, 100 ml Essigester, 20 ml Eisessig
60 ml Wasser

Dünnschicht-Elektrophoresen wurden bei pH 6.5 in

Pyridin-Acetat-Puffer durchgeführt:

4450 ml Wasser, 500 ml Pyridin, 50 ml Eisessig

Ninhydrin-Reagenz

0.2 g Ninhydrin werden in 95 ml absolutem Methanol gelöst
und mit Collidin auf 100 ml aufgefüllt.

Kupfernitrat-Stabilisator

0.2 ml 10% wässrige Salpetersäure werden mit 2 ml kalt gesättigter wässriger Kupfer-II-nitrat-Lösung vermischt und mit Aceton auf 200 ml aufgefüllt.

Chlor-Tolidin-Reagenz zur Detektion von Peptiden (110)

Lösung 1

2% wässrige Natriumhypochlorit-Lösung

Lösung 2

gleiche Volumina einer gesättigten Lösung von o-Tolidin in 2% wässriger Essigsäure und einer 0.85% wässrigen Kaliumjodid-Lösung unmittelbar vor Gebrauch gemischt.

Man besprüht die Platten zunächst mit Lösung 1, dann nach 1 Stunde mit Lösung 2.

6.2 Puffer - Lösungen

Universalpuffer (111)

Zitronensäure-Monohydrat $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	8.4 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	5.44g
Borsäure, $B(OH)_3$	2.47g
Diäthylbarbitursäure, $C_8H_{12}N_2O_3$	7.4 g
2N Salzsäure	20.0 ml
Destilliertes Wasser ad	1000.0 ml

100 ml dieser Stammlösung werden mit 0.2N Natronlauge auf den gewünschten pH-Wert eingestellt, mit Wasser 200 ml aufgefüllt und mit Natriumchlorid auf die Ionenstärke 0.75 gebracht.

0.2M Phosphat-Puffer

Lösung 1

27,22 g Kaliumhydrogenphosphat in 1000.0 ml Wasser gelöst.

Lösung 2

35,6g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat zu 1000.0 ml in Wasser lösen

0.2M Pyrophosphat-Puffer

89.2g Tetranatriumpyrophosphat-Dekahydrat in Wasser zu 1000.0 ml lösen.

0.2M HEPES-Puffer

4.77 g N-2-Hydroxyäthyl-Piperazin-N'-äthan-2-sulfonsäure werden in bidestilliertem Wasser zu 100.0 ml gelöst.

0.1M Ammonbikarbonat-Puffer

7.9 g Ammon-hydrogenkarbonat werden in Wasser zu 1000.0ml gelöst.

0.1M Ammonacetat-Puffer

7.7 g Ammonacetat werden in Wasser zu 1000.0ml gelöst.

6.3 Metall-Salze

Cadmiumacetat-Dihydrat, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.G. 266.53

Calciumacetat-Monohydrat, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, M.G. 176.18

Eisen-II-ammonsulfat-Hexahydrat, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
M.G. 392.16

Eisen-III-ammonsulfat-Dodekahydrat, $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
M.G. 485.21

Kobalt-acetat-Tetrahydrat, $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, M.G. 249.09

Magnesiumacetat-Tetrahydrat $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, M.G. 214.47

Manganacetat-Tetrahydrat $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, M.G. 245.08

Nickelacetat-Tetrahydrat $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, M.G. 248.84

Ammonium-Molybdat-Tetrahydrat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, M.G. 1235.95

Quecksilber-II-acetat, $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, M.G. 318.70

p-Chlor-Quecksilber-natriumbenzoat, $\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_2\text{ClHgNa}$ M.G. 379.2

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) W. Ostwald, Z. Elektrochem., 7, 1003 (1901)
- 2) M.L. Bender, B.W. Turnquest, Am.Soc. 79, 1656 (1957)
- 3) T.C. Bruice, G.L. Schmir, Am.Soc. 79, 1663 (1957)
- 4) W. Langenbeck, R. Mahrwald, Ber. 90, 2423 (1957)
- 5) T.C. Bruice, Proc.Natl.Acad.Sci.US. 47, 1924 (1961)
- 7) M.M. Green, K.C. Tsou, R. Bressler, Am. Seligmann
Arch.Biochem.Biophys. 57, 458 (1955)
- 8) H. Tuppy. U. Wiesbauer, E. Wintersberger, Hoppe Seyler's
Z. Physiol. Chem. 329, 278 (1962)
- 9) G.K. Steigleder, Y.Kamei, R.Kudicke, Arch.klin.exp.Derm
217, 417 (1963)
- 10) M.M.Nachlass, T.P.Goldstein, A.M.Seligmann,
Arch. Biochem.Biophys. 97, 223 (1963)
- 11) W.O'Connell, R.J.Winzler, Canc.Res. 23, 78 (1963)
- 12) E.E. Smith, J.T.Kaufmann, A.M.Rutenberg, J.Biol.Chem.
240, 1718(1965)
- 13) W.Nagel, F.Willig, F.H.Schmidt, Klin.Wschr. 42,447(1964)
- 14) G.G.Glenner, P.J.McMillan, J.E.Folk, Nature, 194,867(1962)
- 15) V.K.Hopsy, K.K.Mäkinen, G.G.Glenner, Acta chem. Scand.
20, 1225 (1966), 20, 1231 (1966)
- 16) H.Zuber, G.Roncari, Angew.Chem. 79, 906 (1967)
- 17) A.J.Kenney, Y.L. Wong-leung, Biochem.J. 110, 26P (1968)
- 18) E.Bernhammer, K.Krisch, Z.Klin.Chem. u.Klin.Biochem.
4, 49 (1966)
K.Krisch, Biochem.Z. 337, 546 (1963)
- 19) S.M.Hardy, J.M. Ritchie, Nature, 209, 76 (1966)
F.Dienstl, S.Sailer, F.Sandhofer, H.Braunsteiner,
Klin.Wschr. 42, 794 (1964)
H.Tuppy, H.Nesvadba, Mh.Chemie, 88, 977 (1957)
R.H.Ehrensing, Proc.Soc.expl.Biol.N.Y. 117, 370 (1960)
- 20) D.E. Koshland Jr. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 44, 98 (1958)
- 21) G.Nemethy, H.A.Scheraga, J.Physic.Chem. 66, 1773 (1962)
- 22) B.G.Malmström, A.Rosenberg, Adv.Enzym. 21, 131 (1960)

- 23) R.C. Bray, K.R. Harap in "Annual Reports on the Progress of Chemistry", Vol. LV (1959), p. 343, The Chemical Soc. London.
- 24) B.L. Vallee in "Proc. of the IVth Intern. Congr. of Biochem. Vienna 1958, Symposium VIII: Proteins, H.Neurath, H.Tuppy (Eds) London, Pergamon Press (1960), p. 138
- 25) B.L. Vallee in "The Enzymes" (2nd ed.) Vol. 3, chap. 15, Ed. P.D. Boyer, H.Lardy, K. Myrback, Academic Press, New York (1960)
- 26) R.C. Warner, Trans. N.Y. Acad.Sci. 16, 182 (1954)
- 27) H.R. Mahler, in "Mineral Metabolism", Vol.1, part B, p. 743, C.L. Connar, F. Bronner (eds) Academic Press, New York (1961)
- 28) A.L. Lehninger, Physiol. Revs. 30, 393 (1950)
- 29) R.J.P. Williams, Biol. Rev. 28, 4 (1953)
- 30) I.M. Klotz in "Mechanisms of Enzyme Action" W.D. McElroy, B. Glass (eds), The John Hopkins Press, Baltimore (1954) p. 257
- 31) E.M. Crook (ed) "Metals and Enzyme Activity", Biochemical Society Symposia, Nr. 15, Cambridge University Press(1958)
- 32) E.L. Smith in "The Enzymes" (2nd ed), P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (eds), Academic Press, New York (1960), Vol. IV, chapter 1
- 33) T.E. Barman, "Enzyme Handbook", Springer, Berlin (1969)
- 34) H. Hanson, H.J. Hutter, H.G. Mannsfeldt, K. Kretschmer, Ch. Sohr, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 680(1957)
- 35) N. Rehfeld, J.E. Peters, H. Giesecke, R.J. Haschen, Acta biol. Med. german. 19, 819 (1967)
- 36) G. Pfeleiderer, P.G. Cellier, M. Stanulovic, E.D. Wachsmuth, H. Determann, G. Braunitzer, Biochem. Z. 340, 552 (1964)
- 37) F. Auricchio, C.B. Bruni, Biochem. Z. 340, 321 (1964)
- 38) N.E. Good, D.G. Winget, W. Winter, T.N. Conolly, S. Izawa, R.M.M. Singh, Biochemistry 5, 467 (1966)
- 39) O. Warburg, W. Christian, Biochem. Z. 311, 209 (1942)
- 40) L. Hellermann, M.E. Perkins, J. Biol. Chem. 112, 175 (1935)
- 41) S.J. Bach, D.B. Whitehouse, Biochem. J. 57, xxx1 (1954)
- 42) M.A. Abu Fadl, E.J. King, Biochem. J. 44, 435 (1949)
- 43) R.G. Pearson, Am.Soc. 85, 3533 (1963), Science, 151, 172 (1966)

- 44) O. Warburg, Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Action, chapter 19, Clarendon Press, Oxford (1949)
- 45) E.A. Stein, E.H. Fischer, J. Biol. Chem. 232, 867 (1958)
- 46) B.L. Vallee, E.A. Stein, W.N. Summerwell, E.H. Fischer, J. Biol. Chem. 239, 2901 (1959)
- 47) L. Michaelis, H. Davidson, Biochem. Z. 35, 386 (1911)
- 48) S.G. Waley, Biochim. Biophys. Acta 10, 27 (1953)
- 49) K.J. Laidler, Trans. Farad. Soc. 51, 528 (1955)
- 50) G.E. Briggs, J.B.S. Haldane, Biochem. J. 19, 338 (1925)
- 51) M. Dixon, Biochem. J. 55, 161 (1953)
- 52) E.D. Wachsmuth, Biochem. Z. 344, 361 (1966)
- 53) K.J. Laidler, "The Chemical Kinetics of Enzyme Action", Clarendon Press, Oxford, (1957), chap.V
- 54) B. Zerner, M.L. Bender, Am. Soc. 83, 2267 (1961)
- 55) R.B. Martin, A. Parcell, Am.Soc. 83, 4835 (1961)
R. Greenhalgh, R.M. Hegglin, M.A. Weinberger, Can.J.Chem. 41, 1662 (1963)
- 56) W.P. Jencks, Am. Soc. 81, 475 (1959)
- 57) T.C. Bruice, S.J. Benkovic: "Bioorganic Mechanisms", W.A. Benjamin, New York, (1966), p. 16
- 58) E.A. Barnard, W.D. Stein, Adv. Enzymol. 20, 51 (1958)
- 59) L. Weil, T.S. Seibles, Arch. Biochem. Biophys. 54, 368 (1955)
- 60) E. W. Westhead, Biochemistry 4, 2139 (1965)
J.S. Bellin, C.A. Yankus, Arch. Biochem. Biophys. 123, 18 (1968)
- 61) H.Z. Pauly, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 94, 284 (1915)
- 62) A.N. Howard, F. Wild. Biochem. J. 65, 651 (1957)
- 63) M. Tabachnik, H. Sobotka, J. Biol. Chem. 234, 1726 (1959)
- 64) G. Gundlach, C. Koehne, F. Turba, Biochem.Z. 336, 215 (1962)
- 65) H. Horinishi, Y. Hachimori, K. Kurihara, K. Kurihara, K. Shibata, Biochim. Biophys. Acta. 86, 477 (1964)
- 66) H. Horinishi, O. Takenaka, K. Shibata, Arch. Biochim. Biophys. 113, 371 (1966)

- 67) H. Horinishi, K. Kurihara, K. Shibata, Arch. Biochem. Biophys. 111, 520 (1965)
- 68) M. Sokolovsky, B.L. Vallee, Biochemistry, 6, 700 (1967)
- 69) T.G. Bak, R. Sato, Biochim. Biophys. Acta 148, 28 (1967)
- 70) R.P. Steiner, Arch. Biochem. Biophys. 115, 257 (1966)
- 71) M. Sokolovsky, B.L. Vallee, Biochemistry, 5, 700 (1967)
- 72) H. Noll, persönliche Mitteilung
- 73) W.D. Brown, Biochim. Biophys. Acta. 44, 365 (1960)
- 74) J.L. Bailey, "Techniques in Protein chemistry", Elsevier Publishing Company, New York, (1962) p. 107
- 75) H. Fasold, Biochem. Z. 342, 301 (1965)
- 76) E.D. Wachsmuth, Biochem. Z. 346, 446 (1967)
- 77) M.E. Koshland, F.M. Englberger, M.J. Erwin, S.M. Gaddone J. Biol. Chem. 238, 1343 (1963)
- J. Wolff, I. Covelli, Biochemistry, 5, 860, 867 (1966)
- 78) I. Covelli, J. Wolff, J. Biol. Chem. 241, 4444 (1966)
- 79) G.L. Schmir, L.A. Cohen, Am. Soc. 83, 723 (1961)
- 80) R. Willstätter, V. Hottenroth, Ber. 37, 1779 (1904)
- 81) A. Wormall, J. Expl. Med. 51, 295 (1930)
- T. Astrup, Acta chem. Scand. 1, 744 (1948)
- L. Ehrenberg, I. Fischer, N. Lofgren, Nature, 157, 730 (1946)
- 82) M. Sokolovsky, J.F. Riordan, B.L. Vallee, Biochemistry, 5, 3582 (1966)
- 83) P. Cuatrecasas, S. Fuchs, C.B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 243, 4787 (1968)
- 84) J.A. Cohen, R.A. Oosterbaan, F. Berends, "Organophosphorous Compounds" in "Methods in Enzymology", S.P. Colowick, N.O. Caplan (eds), Academic Press, New York (1967), Vol. XI, p. 692
- 85) G. Schoellmann, E. Shaw, Biochemistry, 2, 252 (1963)
- 86) E. Shaw, "Site specific Reagents for Chymotrypsin and Trypsin" in "Methods in Enzymology", S.P. Colowick, N.O. Caplan (eds), Academic Press, New York, (1967), Vol. XI, p. 679
- 87) D. Vieth, E. Shaw, unveröffentlichte Ergebnisse
- 88) K.J. Stevenson, L.B. Smillie, J. Mol. Biol. 12, 937 (1965)
- 89) H.J. Schramm, Biochem. Z. 342, 139 (1965)

- 90) F.H. Johnson, H. Eyring, M.J. Polissar, "The Kinetic Basis of Molecular Biology", J. Wiley, New York (1954)
- 91) S. Glasstone, K.J. Laidler, H. Eyring, "The Theory of Rate Processes", McGraw Hill, New York (1941)
- 92) T. Bruice, S. Benkovic, "Bioorganic Mechanisms", W.A. Benjamin, New York (1966) p. 419 pp
D.E. Koshland Jr. J. Theoret. Biol. 2, 75 (1962)
D.E. Koshland Jr. J. Cellular Comp. Physiol. 47, Suppl. 1 217 (1956)
F.H. Westheimer, Adv. Enzymol. 24, 441 (1962)
- 93) E.D. Wachsmuth, I. Fritze, G. Pfeleiderer, Biochemistry, 2, 175 (1966)
- 94) K. Wallenfels, C. Streffer in "Mechanismen enzymatischer Reaktionen", 14. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie, Mosbach 1963, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964) S. 6 und Diskussionsbemerkung von M. Eigen, ibid. S. 42
- 95) D.E. Koshland Jr., Bull. Soc. chim. biol. 46, 1745 (1964)
- 96) F. Bergmann, S. Rimon, R. Segal. Biochem. J. 68, 493 (1958)
F. Bergmann, Advances Catalysis related subjects, 10, 130 (1958)
- 97) R.T. Simpson, J.F. Riordan, B.L. Vallee, Biochemistry, 2, 616, (1963)
- 98) M.L. Bender, B.W. Turnquest, Am.Soc. 79, 1656, (1957)
S.A. Bernhard, H. Gutfreund in K. Ichihara (ed), Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo-Kyoto, Maruzen (1958) p. 124
- 99) B.M. Anderson, E.H. Cordes, W.P. Jencks, J. Biol. Chem. 236, 455 (1961)
- 100) E.S. Gould, "Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie", Verlag Chemie, Weinheim (1964), S. 207
M.L. Bender in "Technique of Organic Chemistry" (2nd ed) Vol. 8, Part IIA, A. Weissberger (ed), J. Wiley, New York (1963), chapter 25
- 101) W.W. Cleland, Adv. Enzymol. 29, 1 (1967)
- 102) J.E. Dowd, D.J. Riggs, J. Biol. Chem. 240, 863 (1965)

- 103) G.N. Wilkinson, Biochem. J. 80, 324 (1961)
104) C. Maurer, Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 6, 217(1968)
106) F. Cramer, "Papierchromatographie", Verlag Chemie,
Weinheim (1953) S. 96
107) T. Wieland, D. Georgopoulos, Biochem. Z. 340, 476 (1964)
108) M. Brenner, A. Niederwieser, Experientia, 16, 378 (1960)
109) G. Pataki, "Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure und
Peptid-Chemie, de Gruyter, (Berlin), (1966), S. 78
110) E.v. Arx, R. Neher, J. Chromatogr. 12, 329 (1963)
111) M. Steiner in "Die Methoden der Fermentforschung",
E. Bamann, K. Myrbäck (eds), Band I, S. 776 ff,
Thieme Verlag, Leipzig 1941

L e b e n s l a u f

- 1937: 23. April geb. in Hamburg
1956: Reifeprüfung in Hamburg
1956 - 1958: Apothekerpraktikant in Hamburg
1958: Pharmazeutische Vorprüfung in Hamburg
1959: Beginn des naturwissenschaftlichen Studiums an der
Universität Hamburg
1964: Wechsel an die Universität Tübingen
1. und 2. Teil der Diplom-Vorprüfung in Physiologischer
Chemie und Biochemie
1967: Diplom-Hauptprüfung in Physiologischer Chemie und
Biochemie
1967-1969: Dissertation an der Abteilung Chemie der Ruhr-
Universität in Bochum

